

THESIS

MUNICH

1967

**Reinigung und Charakterisierung
von Kallikrein
aus Schweinepankreas**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

IGNAZ LAUER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153723_0004

Aus dem Klinisch-chemischen Institut
an der Chirurgischen Klinik
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. W e r l e

Reinigung und Charakterisierung
von Kallikrein
aus Schweinepankreas

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Ignaz Auer
aus Weiden i.d.OPf.

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1967

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung und Thema	6
B. Theoretischer Teil	8
I. Das Kallikrein-System und sein Wirkungsmechanismus	8
1. Vorkommen	8
2. Eigenschaften des Kallikreins	9
3. Biochemischer Wirkungsmechanismus	10
II. Die biologischen Wirkungen des Pankreaskallikrein-Kallidin-Systems	11
1. Pharmakologische Wirkungen	11
a) Periphere Vasodilatation	11
b) Permeabilitätserhöhung der Gefäße und Leukozytenmigration	12
c) Schmerzerzeugung	12
d) Kontraktion glatter Muskulatur	13
2. Physiologische Bedeutung	13
a) Lokale Wirkung	13
α) Hyperämie funktionell stark beanspruchter Organe	14
β) Uteruskontraktion beim Geburtsvorgang	14
b) Allgemeine Wirkung	14
3. Beteiligung an pathophysiologischen Zuständen	14
a) Freisetzung aus der Zelle bei pathophysiologischen Zuständen	15
b) Beteiligung bei Entzündungen	15
c) Beteiligung beim Schock	16
d) Beteiligung bei der Pankreatitis	16
III. Therapeutische Verwendung des Pankreaskallikreins Padutin® bei entzündlichen und funktionellen peripheren Durchblutungsstörungen	17

C. Versuchsteil	18
I. Bestimmungsmethoden	18
II. Bisherige Methode und ihre Nachteile	24
III. Grundlagen der Ionenaustausch- und Adsorptions- chromatographie	25
1. Adsorption	26
2. Ionenaustausch	27
IV. Diskussion und Ergebnisse der Versuche zur Ent- wicklung einer neuen Methode zur Reinigung von Pankreaskallikrein	27
1. Entwicklung der neuen Methode	27
a) Überlegungen zur Reinigung	27
b) Auswahl eines Adsorbens	28
c) Diskussion der verschiedenen Hydroxylapatit- Synthesemöglichkeiten und ihrer Verwendbar- keit für die Pankreaskallikreinreinigung	29
2. Reinigung von Pankreaskallikrein an Hydroxyl- apatit	30
a) Untersuchungen an reinem Hydroxylapatit	30
b) Modifizierung des Hydroxylapatits zur Erhö- hung der Filtrationsrate	33
c) Rechromatographie	34
d) Diskussion und weitere Reinigungsversuche	35
α) mit PAB-Trasylol-Cellulose	
β) mit industriellem Hydroxylapatit mit lang- faseriger Cellulose	
3. Gesamtablauf der Reindarstellung	37
a) Protaminsulfatfällung	37
b) Hauptschritt der Reinigung durch 3-maligen Durchgang an Hydroxylapatit-Cellulose-Säulen	37
c) Entsalzen über Sephadex G-25	38
4. Untersuchung verschiedener Reinheitskriterien	38
a) Elektrophoretische Untersuchungen auf	38
α) Fremdproteine	38
β) verunreinigende Zucker	40

b) Präparative elektrophoretische Reinigung von Pankreaskallikrein zum Vergleich der Reinheit mit nicht elektrophoretisch prä- parativ behandelten Pankreaskallikrein	41
c) Bestimmung der Amino-endständigen Amino- säure durch Edman-Abbau und Dünnschicht- chromatographie	
5. Bestimmung der $K_{m_{BAEE}}$ von Pankreaskallikrein am Autotitrator	42
V. Versuche und Ergebnisse: Versuchsschemata	43
D. Zusammenfassung	64
E. Verzeichnis der Abkürzungen und verwendeten Materialien	65
F. Literaturverzeichnis	

A. Einleitung und Thema

Obwohl von großer biologischer Aktivität in vivo und in vitro, sowie physiologisch von größter funktioneller Bedeutung, wurde eine Gruppe von Wirkstoffen erst spät erkannt. Diese "Kinine" genannten Wirkstoffe liegen im Unterschied zu den ihnen in der pharmakologischen Wirkung und Aktivität sehr nahestehenden biogenen Aminen nicht praeformiert gespeichert vor, sondern werden bei Bedarf enzymatisch aus der inaktiven Vorstufe, dem Kininogen, gebildet. Dieser Umstand weist auf eine enorme biochemische Wirksamkeit der diese Kinine freisetzenden Enzyme, der Kininogenasen, hin.

Die Kininogenase - Kininsysteme sind durch ihre pharmakologische Wirkung, wie

1. Vasodilatation
2. Gefäßpermeabilitätserhöhung
3. Schmerzerzeugung
4. Leukozytenmigration
5. Kontraktion glatter Muskelzellen
6. Bronchokonstriktion

gekennzeichnet.

Als erstes dieser Kinine wurde 1937 von Werle (1) das später Kallidin genannte Kinin beschrieben. Die entsprechende Kininogenase dieses Kininogenase - Kininsystems war das von Werle im Arbeitskreis von Frey und Kraut 1925 aufgefundene Kallikrein (2). Dieses hochaktive Enzym, und zwar das Kallikrein des Pankreas, rein darzustellen, unter Berücksichtigung einer optimalen Ausbeute - eine *conditio sine qua non* für die in unserem Labor durchgeführte Bestimmung der Zusammensetzung des Pankreas-Kallikreins und die jetzt in Angriff genommene Aufklärung der Sequenz des aktiven Zentrums - war die Hauptaufgabe dieser Arbeit.

Nach der Beschreibung der bis heute bekannten biochemischen, physiologischen und pathophysiologischen Wirkungsweise dieses wichtigsten Kinin freisetzenden Enzyms folgen in dieser Darstellung die eigenen Untersuchungen und deren Ergebnisse. Diese beschäftigten sich - wie bereits erwähnt - vor allem mit der Reindarstellung von Pankreaskallikrein über Hydroxylapatit.

Bei der Reinigung ergab sich die Frage, ob zwei verschiedene Pankreaskallikreine vorliegen. Sie wurde bei der Untersuchung verschiedener Reinheitskriterien z.B. anhand von Elektrophorese-Versuchen und der Bestimmung der Amino-endständigen Aminosäure (n) weiter verfolgt. Schließlich wird die Bestimmung der Michaelis-Konstante für Kallikrein bei Verwendung des Substrates N-Benzoyl-L-argininäthylester mit Hilfe eines Autotitrators beschrieben.

B. Theoretischer Teil

I. Das Kallikreinsystem und sein Wirkungsmechanismus

Um Wirkungsweise und Bedeutung des Kallikreins aufzeigen zu können, ist es notwendig, das Kallikrein im gesamten Zusammenhang dieses Kininogenase-Kinin-Systems darzustellen. Neben dem Kallikrein-Kallidinsystem fand man bisher 20 verschiedene Kinine mit dem jeweils freisetzenden Prinzip. Dabei blieben die als erste aufgefundenen Kallikreine (3) das für die physiologische und wohl auch pathophysiologische Kininbildung bedeutendste System. Für die Auffindung und Zuordnung von Kininogenasen zu den Kallikreinen ist die bereits in kleinsten Mengen im Säugetierorganismus hervorrufbare Blutdrucksenkung der wichtigste Test.

1. Vorkommen

Die Kallikreine lassen sich in verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten nachweisen. Nach der Entdeckung des Harnkallikreins 1926 (3) wies Werle im Arbeitskreis von Frey und Kraut 1930 (2) das Pankreas- und Serum-Kallikrein, Werle später das Kallikrein der Gl. Submandibularis nach. Das Pankreas- und Plasma-Kallikrein liegen als inaktive Vorstufe, d.h. als Kallikreinogen vor (4). Das uns interessierende Kallikrein des Pankreas wird als Kallikreinogen zusammen mit den teils inaktiven, teils aktiven Hydrolasen im exokrinen Anteil (Werle 1936 (5)) des Pankreas gebildet. Das Pankreas ist der Syntheseort ausschließlich des Pankreas-Kallikreins, da Pankreatektomie die Konzentration des Serum- oder Harnkallikreins nicht beeinflusst. Mit den anderen Verdauungsfermenten der Bauchspeicheldrüse wird das Pankreaskallikrein in das exkretorische Gangsystem sezerniert. - Die höchsten gefundenen Konzentrationen des Pankreaskallikreins, ca 200 KE/g Parenchymgewebe, finden sich im Pankreas des Hundes. Wir verwendeten in dieser Arbeit Schweinepankreasautolysate zur Reindarstellung des Pankreaskallikreins.

2. Eigenschaften des Kallikreins

Die Kallikreine besitzen eine hochspezifische proteolytische Aktivität. Diese ist - wie im nächsten Kapitel näher ausgeführt wird - mit der kininliberierenden Aktivität identisch. Die Kallikreine sind das einzige - ausgenommen das Serumkallikrein - spezifisch auf die Kininbildung eingestellte System unter den Kininogenasen. Die bis zu den Versuchen in unserem Arbeitskreis vorgelegenen unreineren Kallikreinpräparate zeigen daneben noch eine unspezifische proteolytische Aktivität gegenüber Casein oder Hämoglobin als Substrat. Diese unspezifische proteolytische Aktivität nimmt aber mit zunehmendem Reinheitsgrad der Präparate ab (Trautschold und Mitarbeiter 1965 (6)). Es handelt sich also um proteolytisch aktive Verunreinigungen und zwar mit carboxypeptidaseähnlicher Aktivität.

Neben der obigen hochspezifischen proteolytischen Aktivität zeigen die Kallikreine eine weniger spezifische esterolytische Aktivität, die der kininliberierenden Wirkung parallel läuft. So geht umgekehrt der Hemmung der Kininbildung auch der Verlust an esterolytischer Aktivität parallel. Die proteolytisch aktiven Verunreinigungen besitzen keine esterolytische Aktivität. Diese ist vom Reinheitsgrad weitgehend unabhängig.

Die esterolytische Aktivität - wenn auch weniger scharf begrenzt als die hochspezifisch proteolytische - zeigt doch eine beträchtliche Spezifität, da nur wenige N-substituierte Aminosäureester, wie z.B. BAEE gespalten werden. (s. C I Bestimmungsmethoden 1)

Aus der Analyse weniger reiner Kallikreinpräparate ergab sich die Feststellung, daß es sich bei Kallikrein um ein Glykoprotein handelt (Moriya 1959 (7), Trautschold 1965 (6)). Es gibt Hinweise dafür, daß man ohne Verlust an Aktivität das Kallikrein-Molekül verkleinern, evtl. sogar die Zuckerkomponente abtrennen kann. Daraus ergibt sich die Problematik quantitativer Angaben über die Zusammensetzung des Kallikreins, da die Zusammensetzung des Enzyms von den angewandten Reinigungsverfahren abhängen dürfte.

Nicht nur durch die verschiedenen Syntheseorte, sondern auch durch wesentliche Unterschiede der Eigenschaften läßt sich das Pankreaskallikrein von den übrigen Kallikreinen abgrenzen.

So läßt sich unter anderem eine immunologische Abgrenzung, die nicht an die Intaktheit des aktiven Zentrums gebunden ist, (Habermann 1961 (8), 1962 (9)) durchführen. Zwar ergeben z.B. die Antikörper gegen menschliches Harnkallikrein auch mit Pankreaskallikrein Präzipitationsbanden, wofür aber sicher der geringe Reinheitsgrad der verwendeten Enzympräparate die Ursache ist. - Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal ist auch der Umstand, daß die von uns durchgeführte Reindarstellung von Pankreaskallikrein über Hydroxylapatit sich z.B. mit Submandibulariskallikrein nicht in diesem Maße durchführen läßt.

Da alle Kininogenasen ausschließlich eine proteolytische und esterolytische Aktivität aufweisen, kann ein recht ähnlich gebautes aktives Zentrum vermutet werden. In diese Richtung zeigt die universelle Hemmung der Kininogenasen durch DFP, welches mit dem Hydroxylrest eines definierten Serins im Protein reagiert, was für alle Kininogenasen eine Beteiligung dieser Aminosäure am aktiven Zentrum erwarten läßt.

3. Biochemischer Wirkungsmechanismus

Die anfangs den Kallikreinen selbst zugeschriebene Blutdruckwirksamkeit konnte von Werle 1939 (10) als Folge eines enzymatischen Mechanismus erkannt werden. Es kommt durch die Kininogenase Kallikrein zur Freisetzung des allein wirksamen Kinins, des Kallidins, einem Dekapeptid.

Diese Erkenntnis war um so bedeutender, als man heute weiß, daß auch dem für den "Goldblattmechanismus" verantwortlichen Renin-Angiotensinsystem der Niere ein ähnlicher enzymatischer Freisetzungsmechanismus zugrunde liegt.

Das spezifische Substrat aller 4 bekannten Kallikreine ist das in der α_2 -Globulinfraction wandernde Plasmaglobulin Kallidinogen. Dieses ist sehr wahrscheinlich mit dem Kininogen des weniger stark blutdruckwirksamen Trypsin-Kinin, des Bradykinins, identisch. Werle (11) konnte 1951 zeigen, daß

bei Verwendung von Serum als Kininogen nach erschöpfender Freisetzung durch Kallikrein mit Trypsin kein weiteres Kinin gebildet werden kann. Auch zeigte sich, daß eine maximale Kallidinfreisetzung nur aus dem nativen Serum erfolgt, eine maximale Bradykininfreisetzung dagegen aus einem möglichst denaturierten Kininogenmolekül zu erhalten ist. Das hochspezifisch proteolytisch wirksame Kallikrein braucht für seine kininbildende Wirkung bestimmte Haftstellen am Kininogen-Molekül, wie sie nur das native Protein bietet. Beim Ablauf der kininfreisetzenden Reaktion kommt es im Serum gleichzeitig zu einer Inaktivierung des den gesamten Prozess auslösenden Kallikreins. Für die Kallikreine existieren im Serum wenigstens zwei spezifische Inhibitorkomponenten. Das langsamer eventuell enzymatisch abbauende Prinzip kann von dem rasch wirkenden Kallikreininhibitor unterschieden werden. Auch das biologisch aktive Kinin - in unserem Fall das Kallidin - wird durch spezifische Enzyme, die Kininasen, zu einem biologisch inaktiven Peptid abgebaut. Die letztlich wirksame Aktivität ergibt sich folglich als resultierende aus der Kininbildung und der parallel verlaufenden Inaktivierung der Kininogenase und des Kinins. Dabei übertrifft der Kininabbau die Kininogenaseinaktivierung bei weitem. So erklärt sich, daß eine Kinininjektion zu einer nur kurz anhaltenden Blutdrucksenkung, eine Kallikreininjektion dagegen bei gleicher Anfangssenkung länger anhält. - Zum Vergleich: Für die gleiche Blutdrucksenkung ist die mehrtausendfache Trypsinmenge nötig.

II. Die biologischen Wirkungen des Pankreaskallikrein - Kallidin-Systems

Die Zuteilung von Wirkstoffen zu den verschiedenen Kininogenase-Kinin-Systemen wird ermöglicht durch die gleichartigen pharmakologischen, physiologischen und teilweise pathophysiologischen Eigenschaften, sowie durch die gemeinsame Eigenschaft, nicht vorgebildet zu sein, sondern bei physiologischem Bedarf aus der inaktiven Vorstufe gebildet zu werden.

1. Pharmakologische Wirkungen

a) Periphere Vasodilatation

Noch bis vor wenigen Jahren war die einzige quantitative

Methode zur Kallikreinbestimmung die Messung der blutdrucksenkenden Wirkung eines Kallikreinpräparates und der Vergleich mit einem Standardpräparat. Der Angriff der Kinine erfolgt an den Metaarteriolen und dem proximalen Teil der Kapillaren. Der rasche Abbau des Kallidins beseitigt schnell wieder die durch die Vasodilatation bedingte Erniedrigung des peripheren Widerstandes. Die nach Absinken des systolischen und diastolischen Druckes einsetzende Gegenregulation, nämlich Zunahme der Herzfrequenz und des Schlagvolumens (Gersmeyer 1961 (12), Page 1961 (13), Saameli 1962 (14)) bewirken schnell eine Normalisierung des gesunkenen Blutdrucks.

Durch die Vasodilatation der Peripherie zeigt eine Kallikrein-Kallidininjektion beim Menschen eine Änderung der Durchblutungsgröße der Extremitäten, eine Rötung des Gesichts, vorübergehende Atembeklemmung, Herzklopfen (Konzett 1961 (15), Fox und Lewis 1961 (16)), eine Erweiterung der intracranialen Gefäße und Steigerung des Liquordruckes (Werle und Reeke 1935 (17), Sicuteri 1963 (18), Carpi 1961 (19)).

b) Permeabilitätserhöhung der Gefäße und Leukozytenmigration

Die Kallikreinwirkung auf die Gefäßpermeabilität im Sinne einer Erhöhung derselben wurde ebenfalls als die Wirkung des durch Kallikrein freigesetzten Kallidins erkannt. Deutlich zeigt der Austritt von fluoreszenzmarkiertem Plasmaprotein (Witte 1961 (20) und der Radiogoldtest (Frimmer 1963 (21)) die enorme Permeabilitätserhöhung. Daneben scheint dem Kallikrein-Kallidin-System noch eine Leukotaxinwirkung zuzukommen, wie die vermehrte Ansammlung von Leukozyten an der Injektionsstelle zeigt (Lewis 1964 (22), (23)).

c) Schmerzherzeugung

Zu den 20 weiteren Systemen gehört auch die "pain producing substance". Die starke schmerzherzeugende Wirkung ist nicht nur auf dieses Kinin beschränkt, sondern findet sich auch - etwas schwächer - bei i.c. Injektion von Kallikrein. Dosen,

die für eine Schmerzerzeugung noch unerschwellig sind, verursachen aber doch schon Quaddelbildung und Rötung der Haut (Herxheimer und Schachter 1959 (24)).

d) Kontraktion glatter Muskulatur

Schon geringste Mengen der Kinine im Nanogrammbereich zeigen eine erregende Wirkung auf glattemuskuläre, isolierte Organe, vor allem den Rattenuterus und das Meerschweinchenileum. Auffallenderweise fehlt diese Wirkung in vivo häufig (Levy 1963 (25), Türker 1964 (26)), was wohl auf den sehr raschen Abbau der applizierten Wirkstoffe zurückgeführt werden kann. Das wird durch die Feststellung sehr wahrscheinlich, daß z.B. mit sehr hohen Bradykinindosen eine kontrahierende Wirkung auf den Kaninchenuterus in situ nicht nachgewiesen werden kann, wogegen mit dem in situ nur sehr langsam abgebauten Kinin Elodoisin bereits mit niedrigeren Dosen eine Kontraktion eintritt (Fregnan 1964 (27)). Eine bronchokonstriktorische Wirkung konnte bisher in vivo und in vitro nur an der Meerschweinchenlunge nachgewiesen werden (Moog 1964 (28)). Die myotrope Wirkung ist durch Atropin und Morphin hemmbar (Wiegiershausen 1964 (29)). Daher wird neben der direkten Wirkung auf die Muskelzelle auch ein indirekter Mechanismus über eine Acetylcholin-freisetzung diskutiert.

2. Physiologische Bedeutung

a) Lokale Wirkung

Diese pharmakologischen Wirkungen haben teilweise einen entscheidenden Platz im physiologischen Geschehen des Organismus.

Finden sich schon durchschnittlich 0,2 KE/ml im menschlichen Harn und etwa 3 - 4 KE/ml im Serum als inaktive Vorstufe, so läßt eine funktionelle Bedeutung insbesondere des Pankreaskallikreins schon die Tatsache erwarten, daß im Neugeborenen-Pankreas, ja selbst schon im späteren Foetalstadium, eine fast normale Kallikreinogen-Konzentration vorliegt. Weiterhin weist eine dauernde physiologische

Kallidinbildung durch das Kallikrein, da täglich 10 - 30 µg/ die im Urin ausgeschieden werden (Horton 1960 (30), Abe 1964 (31)), ebenfalls auf die physiologische Rolle des Kallikreins.

Da das Kallikrein sowohl in bestimmten Drüsen als auch im gesamten Gefäßsystem gefunden wird, kann man eine lokale und eine den gesamten Organismus betreffende Kallidinbildung und -wirkung erwarten.

α) Hyperämie funktionell stark beanspruchter Organe.

Dabei nimmt Werle 1950 (4) folgenden Mechanismus an: Die durch den Sekretionsreiz verursachte Änderung der Zellmembran-Permeabilität führt nach Hilton und Lewis 1958 (32) zu einem Austritt der Kallikreine in das Interstitium und setzt dort aus vorhandener Vorstufe Kinin frei. Über eine Gefäßerweiterung kommt es zur lokalen funktionellen Hyperämie. Klinische Symptome der Gefäßpermeabilitätserhöhung sind die nach i.c. Injektion auftretenden Quaddelbildungen (Habermann 1963 (33)) und das genauso hervorgerufene Pfotenödem der Ratte (Stürmer und Cerletti 1961 (34)).

β) Uteruskontraktion beim Geburtsvorgang.

Eine physiologische uteruskontrahierende Wirksamkeit wird dem Kallidin von Werle zusammen mit Effkemann 1941 (35) und Diniz 1962 (36) zugeschrieben, die allerdings von anderen Autoren (Berde 1961 (37)) wegen der Unwirksamkeit der Kinine am menschlichen Uterusstreifen angezweifelt wird.

b) Allgemeine Wirkung

Als allgemeine Reaktionen haben vor allem allgemeine Gefäßerweiterung und Gefäßerweiterung an Organen, die selbst kein Kallikrein besitzen, zu gelten.

3. Beteiligung an pathophysiologischen Zuständen

Eine Beteiligung des Kallikreins an Entzündungs- und Schockvorgängen steht heute außer Zweifel. Neben dem Problem der direkten Beteiligung des Kinins an obigen Vorgängen steht die Frage nach dem Freisetzungsmechanismus der Kininogenasen, in unserem Fall aus der Pankreaszelle.

a) Freisetzung aus der Zelle bei pathophysiologischen Zuständen

Im Falle der kininogenasehaltigen Körperzelle, z.B. der Pankreaszelle, kommt es nach der traumatischen, toxischen, ischämischen oder entzündlichen Zerstörung derselben zur Freisetzung der inaktiven Vorstufe des Pankreaskallikreins. Die gleichzeitige Freisetzung von Trypsinogen und aus nicht kininogenasehaltigen Zellen von Cytokinasen und Hydrolasen ins Interstitium ermöglicht sowohl über die Aktivierung von Trypsin, welches seinerseits das Kallikreinogen aktiviert, sowie die direkte Aktivierung durch Hydrolasen das Wirksamwerden des Pankreaskallikreins. In der abfließenden Lymphe ischämiegeschädigter Gebiete konnte von Lewis 1963 (38) ein kininliberierendes Enzym nachgewiesen werden, das aber erst über die Aktivierung von Serumkallikreinogen wirkt. Da die Kininvorstufe als Plasmaprotein überall auftreten kann, ist somit eine Kininbildung im Interstitium der Gewebe, aber auch rückwirkend im Blut möglich.

b) Beteiligung bei Entzündungen

Die bei Entzündungen gesteigert auftretende Proteinaseaktivität (Menkin 1937 (39), Edery und Lewis 1962 (40), Lewis 1963 (38)) könnte die Ursache einer Aktivierung des Kallikreinogens sein.

Pankreaskallikrein kann über kininogenhaltiges Serum, wie im pharmakologischen Teil ausgeführt wurde, alle Kardinalsymptome der Entzündung, nämlich Kreislaufveränderung, Exsudation und Proliferation nach eingetretender Alteration auslösen.

Die bedeutendste Wirkung dabei ist die zum Ödem führende Permeabilitätserhöhung. - Das Quinke'sche hereditäre, angioneurotische Ödem (Landermann und Webster 1960 (41)) ist Folge dieser Kallikreinwirkung, die durch das Gendefektbedingte Fehlen des sonst im Serum vorliegenden Kallikrein-Inhibitors nicht mehr genügend unterdrückt wird.

Die Schmerzqualität ist der Serotoninschmerzempfindung recht ähnlich, nicht der durch Histamin bedingten.

c) Beteiligung beim Schock

Die Abnahme der Konzentration der Kininvorstufe im Serum nach eingetretenem Schock wird als indirekter Beweis (Webster 1959 (42), Diniz 1961 (43), Werle 1965 (44)) für die pathophysiologische Bedeutung derselben herangezogen. So konnte Werle 1963 (45) bei 15 untersuchten Schockpatienten in jedem Fall eine starke Herabsetzung des Kininogenspiegels auf 25 % des Normalen nachweisen.

d) Beteiligung bei der Pankreatitis

Die wohl entscheidendste Beteiligung des Pankreaskallikreins an pathologischen Vorgängen liegt bei der Pankreatitis vor. Auffallenderweise fand sich (Werle 1964 (46), Trautschold und Mitarbeiter 1965 (6)) bei der Untersuchung der wesentlichsten Proteinasen bei Pankreasautolyse innerhalb von 6 Stunden keinerlei freie Trypsinaktivität, wenn auch der Trypsinogengehalt stark abnahm. Dagegen wurde das gesamte Pankreaskallikreinogen in Kallikrein (25 KE/g) übergeführt. Auch im menschlichen Pankreas konnte 24 - 48 Stunden post mortem nur Trypsinogen und Chymotrypsinogen nachgewiesen werden, kein Trypsin; Kallikrein aber lag zum Teil in aktiver Form vor. Neben der Autolyse geht das Pankreaskallikrein auch bei Pankreatitis in die aktive Form über. - Zum Nachweis bereits geringer Schädigungen des Pankreas, die stets mit der Ausbildung eines Ödems verbunden sind, wird die sog. Fermententgleisung, d.h. der Blut-Diastase und -Lipaseanstieg verwendet. Es ist also Lipase und Diastase vermehrt ins Blut übergetreten. Dasselbe ist mit dem Pankreaskallikrein möglich (Trautschold 1965 (6)). Bei experimenteller Pankreatitis bei Hunden fanden sich hohe Blutkallikreinwerte.

Da die Exsudatbildung einen eiweißhaltigen Flüssigkeits- und damit Kininogenausstrom aus der Gefäßbahn bedeutet, können Kinine bereits im Interstitium des Pankreas gebildet werden. Diese verstärken dann das Ödem durch ihre permeabilitätserhöhende Wirkung. So wird die bedeutende Stellung des Pankreaskallikreins bei der akuten Pankreatitis verständlich:

Stauung im Gangsystem, relative Hypoxie infolge unphysiologisch hohen Sekretionsreizes und extremer Stoffwechselleistung der Zelle führen zum Austritt von Bestandteil des Bauchspeichels in das Pankreasinterstitium. Diese rufen als Entzündungsreiz eine Reaktion des Gefäßbindegewebeapparates, also auch ein Exudat hervor. Neben Serumkallikreinogen, das aus den geschädigten Gefäßen ausgetreten ist, wird im Speichelödem nun das Pankreaskallikreinogen aktiviert. Diese Aktivierung ist von einer Zymogenaktivierung oder einer sog. Restaktivität (Nagel 1964 (47), Nagel 1964 (48)) unabhängig. Sie führt natürlich unmittelbar zur Kininliberierung. Die Kinine verstärken das exudative Stadium und damit das Ödem. Gleichzeitig verursachen sie zunächst lokal im entsprechenden Gefäßbereich durch die Vasodilatation eine verstärkte Stase. Nach anfänglicher Behinderung des Stoffaustausches zwischen Kapillaren und Parenchym tritt eine zunehmende Insuffizienz der Zellen ein, die letztlich zum Zelltod führt. Es sei kurz noch erwähnt, daß parallel dazu die Aktivierung der proteolytischen Enzyme einsetzt, die zur Autolyse der geschädigten Zellen führt. Damit kommt es zur Pankreasnekrose. - Durch diese Nekrosen gelangen jetzt aber in größerem Maße Pankreaskallikrein u.a. Kininogenasen in die Blutbahn und führen im gesamten Gefäßsystem zu einer unkontrollierbaren Kininbildung. Der bei schwerer Pankreatitis häufig auftretende Schock dürfte in wesentlichem Ausmaß darauf zurückzuführen sein.

III. Therapeutische Verwendung des Pankreaskallikreins

Selbst in die Therapie fand das Kallikrein durch seine enorme periphere Vasodilatation Eingang. In Form des Padutin^R wird es bei entzündlichen wie funktionellen peripheren Durchblutungsstörungen angewendet (Dennig: Lehrbuch der inneren Medizin (49)).

C. Versuchsteil

I. Bestimmungsmethoden

1. Methode zur Bestimmung der Aktivität von Kallikrein

a) Theoretische Grundlage der in vitro Bestimmungsmethoden

Der kininbildenden Kallikreinwirkung völlig parallel geht die esterolytische Aktivität. Mit zunehmender Geschwindigkeit werden gespalten: N-Acetyl-L-tyrosin-äthylester, N-Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester, N-Benzoyl-L-arginin-methylester und N-Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE).

b) Bestimmung des freigesetzten Äthanol mit der Alkoholdehydrogenase (ADH-Methode)

Prinzip: Das nach der Esterspaltung aus BAEE freigesetzte Äthanol wird nach der Methode von Bücher 1951 (50) und Bonnichsen 1951 (51) bestimmt. Die Konzentrationsverhältnisse sind so gewählt, daß nur die Esterspaltung geschwindigkeitsbegrenzend ist.

Lösungen:

- 1) Pyrophosphatpuffer (15,2 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ + 4,1 g Semicarbazidhydrochlorid + 0,9 g Glycin in 400 ml Wasser lösen, ad pH 8, 7 einstellen und ad 500 ml auffüllen)
- 2) BAEE-Lösung (3×10^{-3} M)
- 3) NAD-Lösung $c = 20$
- 4) ADH (30 mg Protein/ml)

Messung: Meßstrahlung 366 m μ ; Schichtdicke 1 cm; Küvettenvolumen 3,0 ml; Meßtemperatur 25°C; Meßzeit 10 min.

Vergleichsküvette: 0,1 ml NAD; 2,38 ml Puffer; 0,02 ml ADH.

Meßküvette: 0,1 ml NAD; 2,28 ml Puffer; 0,02 ml ADH und 0,10 ml Probelösung.

Ansätze 10 min bei 25°C stehen lassen; der Start erfolgt durch Zugabe von je 0,5 ml BAEE-Lösung. Beginn der Meßzeit etwa nach 10 min.

Berechnung: Die Berechnung kann entweder als Relativmessung durch Vergleich mit einem Standardpräparat erfolgen oder aus den absoluten Extinktionswerten nach der für alle NAD-NADH-abhängigen Reaktionen gültigen Formel (BERGMEYER 1962 (52)).

2. Proteinbestimmung

Um die spezifische Aktivität und damit die Reinheit eines Pankreaskallikreinpräparates hinsichtlich des Proteingehaltes charakterisieren zu können, muß eine Proteinbestimmung des Präparates durchgeführt werden.

Bestimmung des Proteins mit Biuret

Prinzip: Bei Lösungen, die über 0,1 mg/ml Proteine enthalten, können wir für die Bestimmung die Biuretreaktion verwenden. Dabei wird der Farbumschlag einer Fehling'schen Lösung nach Einwirkung auf das Präparat photometrisch bestimmt (Weichselbaum 1946 (53)).

Lösungen:

1. Fehling'sche Lösung (in 400 ml 0,2 n Natronlauge löst man 9 g Seignettesalz. Danach werden 3 g Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) vollständig in Lösung gebracht. Anschließend gibt man 5 g Kaliumjodid hinzu und füllt mit 0,2 n Natronlauge auf 1 000 ml auf.)
2. Leerwert: 5 ml Aqu.bidest. + 5 ml Biuretreagenz.
3. Testwert: Bis zu 1 ml Proteinlösung + Aqu.bidest.auf 5 ml + 5 ml Biuretreagenz.

Messung: Meßstrahlung 546 m μ ; Schichtdicke 1 cm; Küvettenvolumen 3,0 ml; Meßtemperatur 25°C;

Ansätze 30 min stehen lassen, während sich die Reaktion abspielt. Dann gießt man die Lösungen in die Küvetten und misst die Extinktion.

Berechnung: Die Extinktion wird mit 39 multipliziert und ergibt die Proteinmenge in mg, die sich im Ansatz befunden hat.
 $E_{546} \cdot 39 = \text{mg Protein.}$

3. Edmanabbau

Prinzip: Durch Cyclisierung mit Phenylisothiocyanat wird die Amino-endständige Aminosäure vom Protein abgespalten.

Durchführung: 0,2 - 0,3 μ Mol Protein in 66 %iger Pyridinlösung aufnehmen, und zwar in 2 ml. Diese 2 ml mit 0,05 - 0,1 ml Phenylsenföl mischen. Bei 37° C 2 Stunden inkubieren. Dann im Rotationsverdampfer zur Trockne einengen. Im Vakuum das überschüssige Phenylsenföl absublimieren. Den Rückstand in 5,0 - 10,0 ml Trifluoressigsäure aufnehmen und 4 Stunden bei 20° C inkubieren. Im Vakuum einengen, im Exsikkator über KOH die Trifluoressigsäurereste entfernen. In 3 ml Aqu.dest. das Präparat wieder aufnehmen. Diese Lösung mit Essigsäureäthylester mischen. Es tritt nach einiger Zeit eine Phasentrennung ein; in der Esterphase findet sich die Phenylthiocarbamylaminosäure, in der H₂O-Phase das Restpeptid.

Bestimmung der Phenylthiocarbamylaminosäure

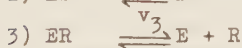
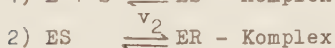
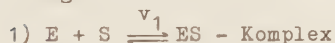
Die PTH-Aminosäure wird dünnschichtchromatographisch bestimmt.

4. Bestimmung der Michaeliskonstante K_m

a) Theoretische Grundlage der Versuche zur Bestimmung der Michaeliskonstante K_m

Allgemeine Grundlage

Entsprechend dem Postulat des Enzym-Substrat-Komplexes bei Enzym katalysierten Reaktionen lassen sich folgende Gleichungen aufstellen:



Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit kann man die Zahl der je Zeiteinheit entstehenden Moleküle des Reaktionsprodukts nehmen. Da $v_1 \gg v_2$ und ebenso $v_2 \ll v_3$ ist, ergibt sich: $v_{\text{gesamt}} \hat{=} v_2$

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird also vor allem durch v_2 bestimmt. Es ist nun vorausgesetzt, daß die obige Reaktion stark exergonisch ist, also das Gleichgewicht stark rechts liegt und R in einer praktisch vollständig ablaufenden Reaktion entsteht.

Das Massenwirkungsgesetz der Reaktion 1 ergibt:

$$(4) \frac{[E_{\text{frei}}][S_{\text{frei}}]}{[ES]} = K_s$$

Diese Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes entspricht der "Substratkonstanten" und ist dann mit der gesuchten Michaeliskonstanten K_m identisch, die sich allein aus der Reaktionsgeschwindigkeit ermitteln läßt, wenn sich die Gültigkeit der Voraussetzung verifizieren läßt, daß v_2 geschwindigkeitsbestimmend ist. - Meist ist diese einschränkende Voraussetzung erfüllt. Man kann somit schreiben:

$$(5) \frac{[E_{\text{frei}}][S_{\text{frei}}]}{[ES]} = K_m$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist nach (1) - (3) der Konzentration von ES proportional:

$$(6) v = f \cdot [ES]$$

Geht man von einer gegebenen Enzymmenge aus und erhöht die Substratkonzentration nach und nach, so liegt entsprechend Gleichung (5) immer mehr E als ES vor, d.h. v steigt (6). Letztlich liegt praktisch alles E als ES vor, so daß:

$$(7) v_{\text{max}} = f \cdot [E_{\text{ges}}]$$

Rechnerisch ergibt sich somit

$$(8) [E_{\text{ges}}] = [E_{\text{frei}}] + [ES] \quad (9) [S_{\text{ges}}] = [S_{\text{frei}}] + [ES]$$

Da in der Regel mit sehr hohen Substratkonzentrationen gearbeitet wird, kann [ES] vernachlässigt werden, so daß

$$[S_{\text{ges}}] = [S_{\text{frei}}]$$

$$(10) \frac{v}{v_{\text{max}}} = \frac{[ES]}{[E_{\text{ges}}]}$$

$$(11) \frac{([E_{\text{ges}}] - [ES]) \cdot [S_{\text{ges}}]}{[ES]} = K_m$$

$$(12) \frac{[E_{\text{ges}}] \cdot [S_{\text{ges}}]}{[ES]} - [S_{\text{ges}}] = K_m$$

$$(13) \quad \frac{[E_{ges}]}{[ES]} - 1 = \frac{K_m}{[S_{ges}]}$$

$$(14) \quad \frac{K_m}{[S_{ges}]} + 1 = \frac{[E_{ges}]}{[ES]}, \quad \frac{K_m}{[S_{ges}]} + 1 = \frac{v_{max}}{v}$$

$$(15) \quad v = \frac{v_{max} \cdot [S_{ges}]}{K_m + [S_{ges}]} = f \cdot \frac{[E_{ges}] \cdot [S_{ges}]}{K_m + [S_{ges}]}$$

Die Sättigungskonzentration läßt sich aber im Gegensatz zu v_{max} schlecht aus der Kurve, auf welcher die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (bei gleicher Enzymkonzentration) aufgetragen wurde, ablesen; denn diese Kurve nähert sich v_{max} asymptotisch.

$$\text{Wenn } \frac{v}{v_{max}} = \frac{1}{2}, \text{ dann: } \frac{v_{max}}{2 \cdot v_{max}} = \frac{S_{ges}}{K_m + S_{ges}}$$

$$K_m + [S] = 2 [S_{ges}]; \quad K_m = [S_{ges}.]$$

Diese Substratkonzentration, bei der halbmaximale Geschwindigkeit erreicht ist, ist also gleich der Dissoziationskonstanten des ES-Komplexes und nach Gleichung (5) meist gegebener Voraussetzung gleich $K_m \left[\frac{\text{Mol}}{l} \right]$

K_m läßt sich, - da die Substratkonzentration, bei der halbmaximale Geschwindigkeit herrscht, also 50 % des Enzyms als ES vorliegen, sich genau bestimmen läßt, - dadurch ermitteln, daß die Substratkonzentration bei gegebener Menge Enzym derartig verändert wird, daß die bei niedriger Substratkonzentration vorliegende Reaktion erster Ordnung letztlich in eine Reaktion nullter Ordnung übergeht, deren Geschwindigkeit $v = v_{max}$ gemessen wird. Wie auch aus Gleichung (15) ersichtlich, sind die Reaktionen erster Ordnung von der Substrat- und Enzymkonzentration abhängig - letztere bleibt im Versuch immer gleich -, wogegen bei Erreichen der Sättigungskonzentration v nur mehr von der Enzymkonzentration, welche gleich bleibt, abhängt. - Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß auch bei völliger Substratsättigung durch die mit Zunahme

des Reaktionsproduktes immer stärker werdende Rückreaktion praktisch nur im Anfangsgeschwindigkeitsbereich eine Reaktion nullter Ordnung zuläßt.

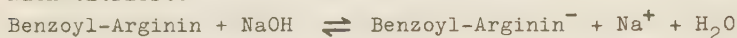
Theoretische Grundlage zur speziellen Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m für Pankreaskallikrein bei

Verwendung des Substrates BAEE im Autotitratator.

Pankreaskallikrein katalysiert die Reaktion



Die freiwerdende Carboxylgruppe des Benzoylarginins wird mit NaOH titriert.



Somit ist ein Mol verbrauchtes NaOH äquivalent einem Mol BAEE.

b) Experimentelle Durchführung

1. Prinzip: Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wird die Konzentration des in der Zeiteinheit entstandenen Benzoylarginins, meßbar durch die äquivalente Menge verbrauchte NaOH, verwandt. Die Geschwindigkeit $v \left[\frac{\text{ml NaOH}}{10 \text{ cm}} \right]$

wird auf der Koordinate aufgetragen. Die auf der Abszisse aufgetragene BAEE-Konzentration hat die Dimension mg/ml.

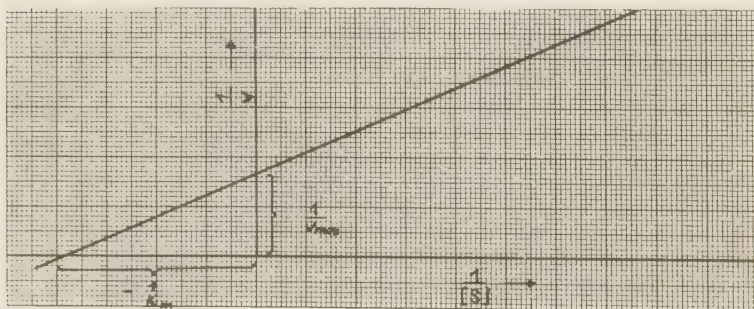


Abbildung 1: Graphische Bestimmung von K_m nach Lineweaver und Burk. Erklärung im Text.

Lösungen:

1. Eine Ampulle Titrisol 0,1 n NaOH wird im Meßkolben mit Aqu.dest auf n/100 NaOH verdünnt.
2. 200 mg BAEE in 50 ml NaCl-Lösung gelöst, also 4 mg BAEE/1 ml 1 %ige NaCl-Lösung.
3. 600 KE gereinigtes Pankreaskallikrein in 5 ml Aqu.dest und 1 ml 1 %ige NaCl gelöst, also 5 KE/0,1 ml Lösung.
4. Eichpuffer zur Eichung des Autotitrators.

Messung: Es werden gemessen:

1. Die eingesetzten mg BAEE
2. Die Titriermenge n/100 NaOH nach 10 cm Laufzeit in ml
3. Die pH-Änderung

Berechnung:

$$- \frac{1}{K_m} \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg}} \right] = x \quad \left(- \frac{1}{K_m} \text{ wird aus der graphischen Bestimmung ermittelt} \right)$$

Umrechnung in Mol/l; da das Molekulargewicht von BAEE 342,6 ist, ergibt sich:

$$x \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] : 342,6 = K_m \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right]$$

II. Bisherige Methode und ihre Nachteile

Die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Reinigung von Pankreaskallikrein war notwendig geworden, da das bisher bekannte Verfahren (Trautschold 1965 (5)) sehr aufwendig und verlustreich war, bezogen auf die Kallikreinausbeute. Die Forderung nach einem maximal reinen Pankreaskallikrein war neben optimaler Ausbeute und Wirtschaftlichkeit des Darstellungsverfahrens die Voraussetzung für die nun in Angriff genommene Ermittlung der Sequenz des aktiven Zentrums, aber auch der in unserem Labor durchgeführten Bestimmung der Zusammensetzung des Pankreaskallikreins (Fritz und Werle 1966 (54)).

In dem bisher bekannten Reinigungsverfahren wird das von Bindegewebe und Fett befreite, im Fleischwolf zerkleinerte Pankreas nach Toluolzusatz 24 - 48 Stunden bei 37° C autolytisiert. Das Autolysat wird 1 : 3 mit Wasser zersetzt und mit 1/5 des

Gesamtvolumens an 10 %iger kolloidaler EisenoxydLösung gemischt. Aus der filtrierten ProteinLösung wird ein Aceton-trockenpulver gewonnen. Dieses ist das Ausgangsmaterial für die weitere Reinigung; die spezifische Aktivität beträgt 10 KE/1 mg Protein. Das in Wasser suspendierte und 20 Stunden gegen 2 x 50 l Aqua.dest bei 0°C dialysierte Acetontrockenpulver wird über eine DEAE-Cellulose, die mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 6, 8 vorbehandelt wurde, gegeben. Nach Waschen mit 0,2 %igem NaCl-Puffer wird mit NaCl-Puffer-Gradienten eluiert. Das im Durchschnitt in ca 65 %iger Ausbeute eluierte Pankreaskallikrein hat eine Reinheit von ca 3 μ g Protein/KE, die durch Rechromatographie bei einer ca 65 %igen Ausbeute bis ca 2 μ g Protein/KE gesteigert werden kann. Damit ist die durch DEAE-Säulenchromatographie maximal erreichbare Reinheit erreicht. Durch Protaminsulfatfällung, Dialyse und Fraktionierung an Sephadex G-25 nimmt die spezifische Aktivität des Pankreaskallikreins, von dessen ursprünglicher Gesamtaktivität in dieser Stufe der Reinigung nur mehr ca 50 % vorhanden sind, nicht mehr zu. Erst die Elektrophorese mit äthanolisierter Cellulose als Träger an einer Porath-Säule führt - jedoch unter großen Verlusten - zu Präparaten, deren reinste Fraktion 0,8 μ g Protein/KE zeigt. Nur mehr 20 % der auf die Elektrophorese aufgebrachten Aktivität läßt sich wieder auffinden. Entsalzen an Sephadex G-25 und Lyophilisieren schließen die Reindarstellung ab.

III. Grundlagen der Ionenaustausch- und Adsorptionschromatographie

Unsere Überlegungen gingen dahin, ob nicht durch andere Ionenaustauscher oder Adsorptionsmittel im Zusammenwirken mit gewissen bei der Pankreasautolyse beobachteten Eigenschaften des Pankreaskallikreins eine Reindarstellung ohne die elektrophoretische Endreinigung zu erreichen sei. Als Chromatographie bezeichnet man allgemein ein Verfahren, bei dem eine Lösung zu trennender Stoffe eine unlösliche Substanz, die in mehr oder weniger verteilter Form vorliegt, in einer bestimmten Richtung durchströmt, wobei die einzelnen Komponenten, gleichgültig durch welchen Mechanismus

(Adsorption, Ionenaustausch, Verteilung) selektiv verzögert werden. Ganz allgemein (Strain 1951 (55)) kann als Chromatographie die unterschiedliche, gerichtete Wanderung der zu trennenden Stoffe durch ein mehr, meist 2-phasisches System unter Ausbildung reversibler Gleichgewichte gelten.

1. Adsorption

Die Anreicherung eines Stoffes, der in der einen Phase gelöst ist, an der Grenzfläche zwischen den Phasen nennt man Adsorption. Die Menge des durch temperaturabhängige Adsorption von einer bestimmten Oberfläche aus einer Lösung aufgenommenen Stoffes hängt außer von der Natur des Adsorbendums, des Adsorptionsmittels und des Lösungsmittels auch von seiner Konzentration ab. Die bei bestimmter Temperatur adsorbierte Menge Stoff gegen die Konzentration aufgetragen, mit der sich der adsorbierte Stoff im Gleichgewicht befindet, ergibt eine typische gegen die Konzentrationsachse konkave parabelartige Kurve, die Adsorptionsisotherme.

Deren Verlauf zeigt, daß bei niedriger Konzentration ein verhältnismäßig größerer Anteil des Stoffes adsorbiert wird als bei höherer Konzentration. Letztlich wird überhaupt nichts mehr adsorbiert; die Oberfläche ist gesättigt. Die Kräfte der Adsorption sind die gleichen, die auch sonst für die Verbindung von Molekülen unter sich verantwortlich sind. Meist handelt es sich um sehr lockere Bindungen durch schwache physikalische Kräfte wie elektrostatische Anziehung zwischen permanenten Dipolen, polarisierbaren Molekülen oder Ionen, sowie um van der Waalsche Kräfte, von der Oberfläche und damit vom Molekulargewicht abhängige Oberflächenkräfte oder chemische Kräfte wie H-Brücken, Komplexbildung u.ä..

Die chromatographische Analyse gestattet feinste Unterschiede in der Affinität zwischen Adsorbens und adsorbierten Stoffen für die Trennung auszunutzen.

Bei der Eluierung wird ein Lösungsmittel verwendet, aus dem die Stoffe etwas weniger gut adsorbiert werden als aus dem ersten Lösungsmittel. In meist scharf abgegrenz-

ten Zonen wandern diejenigen Stoffe am schnellsten, bei denen die Affinität zum Adsorbens am geringsten ist.

2. Ionenaustausch

Bei diesem stark pH-abhängigen Vorgang wird nicht die ganze Verbindung, sondern nur ihr Kation bzw. Anion festgehalten und ein gleichsinnig geladenes Ion geht aus dem Austauscher mit dem entgegengesetzt geladenen Ion des Stoffes ins Filtrat. Der Ionenaustausch ist stöchiometrisch und reversibel und zeigt alle Merkmale eines Gleichgewichts und folgt dem Massenwirkungsgesetz. Die Ionenaustauscher können auch als hochmolekulare Säuren oder Basen betrachtet werden. Für eine ähnliche pH-Abhängigkeit bei manchen Adsorptionssystemen, z.B. Kohle nimmt man dagegen an, daß z.B. eine schwache Säure im saueren Medium (R-H) besser adsorbiert wird als im alkalischen (R^-), weil das Anion hydratisiert wird. Es wird also nicht das Adsorbens - wie bei den Ionenaustauschern - vom pH beeinflusst, sondern die Gleichgewichtskonzentration der besser adsorbierbaren Form der Substanz erhöht. - Für den Austausch wichtige Faktoren sind die Ladung und der Ionenradius. Auch hier ist z.B. bei anorganischen Kationen nicht der aus kristallographischen Daten errechnete Radius maßgebend, welcher den minimalen Abstand der Ionen in den Kristallgittern angibt, sondern der weniger exakt definierte Radius der hydratisierten Ionen. Bei nicht zu hoher Konzentration werden die Ionen um so leichter vom Austauscher aufgenommen, je größer ihre Ladung ist und bei gleicher Ladung um so leichter, je höher das Molekulargewicht - je kleiner die Wasserhülle - ist.

IV. Diskussion und Ergebnisse der Versuche zur Entwicklung einer neuen Methode zur Reinigung von Pankreaskallikrein

1. Entwicklung der neuen Methode

a) Überlegungen zur Reinigung

Auffallenderweise fand sich bei der Untersuchung der wesentlichsten Proteinasen bei Autolyse von Pankreas-homogenaten innerhalb eines Zeitraumes von 6 Stunden

nach Autolysebeginn, keinerlei freie Trypsin- oder Chymotrypsinaktivität. Der Trypsinogengehalt nahm aber auf 50 % ab, ähnlich das Chymotrypsinogen. Dagegen wurde das gesamte Pankreaskallikreinogen in Kallikrein (25 KE/g Parenchym; Hund) übergeführt.

Im menschlichen Pankreas 24 - 48 Stunden post mortem untersucht, konnte ebenfalls nur Trypsinogen und Chymotrypsinogen nachgewiesen werden. Aber auch hier lag Kallikrein in aktiver Form vor. Der Abfall der Trypsinogen- und Chymotrypsinogenkonzentration, der entweder durch unspezifischen Abbau des Trypsinogens oder über eine intermediäre Trypsinaktivierung mit anschließender Selbstverdauung des Trypsins bewirkt wird, sowie der Abbau eines Großteils der übrigen Eiweiße führt zu einer nachweisbaren Zunahme von Eiweißspaltprodukten. Das Pankreaskallikreinogen aber wird in diesem Zeitraum der Autolyse aktiv, nicht jedoch wie die übrigen Eiweiße abgebaut.

Dieser Umstand wird zur Abtrennung des Pankreaskallikreins von den übrigen Eiweißen, besonders den übrigen Kininogenasen des Pankreas mitverwendet. Wie spätere Untersuchungen aus an dem von uns dargestellten Pankreaskallikrein ergaben (56), ist dieses wahrscheinlich von einer Kohlehydrathülle umgeben, die als Schutz gegen die autolytische Zersetzung wirkt. Das Pankreaskallikrein liegt somit weiterhin mit seinem weitaus höheren Molekulargewicht als die meisten anderen Eiweiße, die bei der Autolyse abgebaut wurden, in der Lösung vor. Die Ausgangsproteinklösung zur beabsichtigten Reinigung zeigte eine spezifische Aktivität von ca 10 KE/1 mg Protein (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 9).

b) Auswahl eines Adsorbens

Der Chromatographievorgang bei der Adsorptionschromatographie hängt hauptsächlich von der sog. surface adsorption ab, also von Kräften, die vom Ausmaß der Oberfläche des Adsorbens bestimmt werden. Substanzen mit hohem Molekulargewicht werden adsorbiert, da sich die Kräfte addieren, Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht laufen durch.

Die verschiedenen Calcium-Phosphate, vor allem Hydroxylapatite zeigen diese Voraussetzung und sind gerade zur Adsorption von Molekülen mit hohem Molekulargewicht geeignet. So werden Proteine mit höherem Molekulargewicht, Enzyme, Nukleinsäuren und teils auch Viren bevorzugt festgehalten. Niedrige Peptide, Farbstoffe und Aminosäuren durchlaufen die Säulen dagegen ungehindert.

Erste Versuche zur Reinigung von Pankreaskallikrein an käuflicher Hydroxylapatit-Cellulose¹ brachten bei auffallend hoher Tropfgeschwindigkeit der Säulen keine Reinigung. Das Kallikrein wurde größten Teils überhaupt nicht adsorbiert, da ca 70 % des auf die Säule aufgetragenen Kallikreins bereits beim Auftragen oder beim ersten Waschen wieder im Durchlauf erschienen (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 1). Wir versuchten daher Hydroxylapatit selbst herzustellen, um damit die prinzipielle Verwertbarkeit des Hydroxylapatits zur Reinigung von Pankreaskallikrein untersuchen zu können.

c) Diskussion der verschiedenen Möglichkeiten zur Synthese von Hydroxylapatit und dessen Verwendbarkeit für die Reinigung von Pankreaskallikrein

Seit der ersten Verwendung von Calciumphosphat zur Reinigung von Proteinen sind viele Modifikationen zur Enzymreinigung ausgearbeitet worden.

Ein nach Hayek und Stachelmann (57) gewonnenes Hydroxylapatit ist erfahrungsgemäß äußerst feinkörnig. Da bei kleinen Korngrößen ein größerer Reibungswiderstand für durchströmende Flüssigkeiten gegeben ist, nimmt die Fließgeschwindigkeit mit abnehmender Korngröße ebenfalls ab. Neben Schwierigkeiten beim Schütten ist daher eine extrem geringe Filtrationsrate zu erwarten.

MacIntire, Palmer und M. (58) erhielten 1945 nach Fällung von Calciumchlorid mit Dinatriumhydrogenphosphat im Alkalischen eine Mischung von Calciumphosphat und einer beträchtlichen Menge Hydroxylapatit. Dieses Material aber ergibt ebenfalls zu dicht gepackte Säulen. So ist neben geringer Kapazität auch hier die minimale Fließgeschwindigkeit von Nachteil. Es muß daher mit Supercel vor dem

"packing" gemischt werden, das durch starke Protein-Eigenadsorption die Ergebnisse verkompliziert.

Calciumhydrogenphosphat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), erhalten durch Fällung von 0,5 M Calciumchlorid und 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat bei Raumtemperatur läßt sich nach Tiselius gut packen. Es zeigt bei guter Filtrationsrate eine auffallende Instabilität bei pH-Schwankungen über pH 7,0. Es geht dann teilweise in eine andere Modifikation, nämlich Hydroxylapatit über, unter Freisetzung von freier Phosphorsäure. Zur Erzielung einer scharfen Trennung aber ist die Einheitlichkeit der Korngröße von entscheidender Bedeutung. Ereignet sich die Modifikationsänderung während der Reinigung, so sind keine scharfen und keine einheitlichen Zonen zu erwarten.

Einen grobkörnigen und auch bei pH-Schwankungen zwischen pH 5,5 - 10,0 stabilen Hydroxylapatit konnte Tiselius 1956 (59) durch Behandlung von Calciumhydrogenphosphat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) mit Alkali unter Erhitzen gewinnen. Das nach Tiselius erhaltende Calciumphosphat ist sehr stabil und zeigt vor allem gleichmäßige Korngröße. Dieser Hydroxylapatit ist aber ebenfalls nicht rein. Bei Röntgenuntersuchungen wurde ein molares Verhältnis von Calciumphosphat von 1,532 anstatt 1,667 gefunden. So ist entweder die Überführung in Hydroxylapatit nicht vollständig oder austauschbare Natrium-Ionen oder Phosphat-Ionen sind in das Gitter eingetreten.

Wegen der einheitlichen Korngröße und der damit möglichen scharfen Zonentrennung, wegen der größeren Korngröße und der damit erreichten höheren Filtrationsrate, sowie wegen der pH-Stabilität wird die Hydroxylapatit-Synthese nach Tiselius durchgeführt (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 2) und dieser für alle weiteren Reinigungsversuche verwendet.

2. Reinigung von Pankreaskallikrein an Hydroxylapatit

a) Untersuchungen an reinem Hydroxylapatit (nach Tiselius)

Die allgemeine Erfahrung zeigt, daß Calcium-Phosphate Proteine aus Lösungen mit niedrigen Phosphatpufferkonzentra-

tionen stark adsorbieren und bei höheren Pufferkonzentrationen die Proteine wieder eluiert werden können. Dabei ist die Erhöhung der Pufferkonzentration wirksamer als pH-Änderungen. Das Hydroxylapatit nach Tiselius wurde bei gleicher Phosphatpufferkonzentration und dem gleichen pH, mit denen die Synthese abgeschlossen wurde, zur Untersuchung seiner Verwendbarkeit zur Reinigung von Pankreaskallikrein eingesetzt.

Die Pankreaskallikreinlösung wurde unter Druck (Saugstrahlvakuum) aufgetragen (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 3). Hinweise auf eine erfolgte Adsorption ließen sich aus dem Auftreten dreier deutlich voneinander abgrenzbarer brauner Zonen auf der Säule entnehmen. Dabei waren nur geringste Pankreaskallikrein-Mengen aus der Säule ausgetreten (siehe Abbildung 2).

Stunden nach dem Auftragen des Kallikreins auf die Säule	$\Delta E/\text{min}/3 \text{ ml}$	KJ/ml
12	0,003	ca 3
14	0,006	ca 5
15	0,006	ca 5
18	0,004	ca 4

Abbildung 2

Eine Überladung der Säule ist also noch nicht erfolgt und damit die Kapazität der Säule noch nicht voll ausgenutzt.

Waschen mit 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, brachte als erstes eine starke, wenn auch nicht vollständige Abtrennung der Farbstoffe, in dem diese eluiert werden. Die Konzentration von Eiweiß im Eluat blieb dabei sehr niedrig. Erst nach einigen Stunden, sich ein wenig mit der dritten Farbzone überschneidend, begann die Konzentration von Eiweiß im Eluat bedeutend anzusteigen. Die Kallikreinaktivität blieb während dieser Abtrennung der Fremdproteine im Eluat sehr niedrig, zeigte aber einen auffallenden kleinen Vorpeak von Pankreaskallikrein (siehe Abbildung 3).

Stunden des Waschens	Δ E Biuret/ml	mg Protein/ml	ml μ g Protein/KE	
ca 8	0,015	0,600	50	200
10	0,026	1,016	80	127
13	0,016	0,624	52	155

Abbildung 3

Die Frage, ob das trotz der hohen Eiweißkonzentration bisher nicht im Durchlauf aufgetretene Pankreaskallikrein

- 1 a) wirklich vom Hydroxylapatit adsorbiert wurde
b) und zwar reversibel,
oder ob
- 2 das bisherige Fehlen von Kallikreinaktivität lediglich durch Denaturierung des Kallikreins bedingt war,
wurde durch das peakförmige Ansteigen der Kallikreinkonzentration nach Elution mit 0,5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, geklärt. - Das Pankreaskallikrein wurde danach vollständig und reversibel von dem Hydroxylapatit (nach Tiselius) adsorbiert.

Die Ausbeuten gestalteten sich folgendermaßen:

Aufgetragen:	18 471 KE	100 %
Verlust durch Waschen:	950 KE	4,6 %
Eluieren:	13 630 KE	74 %
Nachlauf:	102 KE	0,6 %
Gesamtausbeute:	14 682 KE	79,2 %

Die Ausbeute nach Elution betrug also 75 %, insgesamt wurden 80 % der Gesamtaktivität wieder aufgefangen.

Da das über Hydroxylapatit gereinigte Kallikrein sehr schnell einen üblen Geruch annimmt - wohl als Folge bakterieller Tätigkeit - wurden bei allen weiteren Versuchen die Kallikreininlösung, sowie Wasch- und Elutionspuffer mit Chloroform gesättigt. Dadurch ließ sich die bakterielle Tätigkeit unterdrücken.

b) Modifizierung des Hydroxylapatits zur Erhöhung der Filtrationsrate

Die erfolgreiche reversible Adsorption von Pankreaskallikrein an reinen Hydroxylapatit zeigte den großen Nachteil einer sehr kleinen Filtrationsrate, wenn das Hydroxylapatit in Säulenform verwendet wird. Ein Versuch mit reinen Hydroxylapatit zieht sich über Tage hin. Während dieses langen Zeitraumes ist die Bildung schwer abtrennbarer denaturierter Eiweiße zu befürchten. Eine bedeutende Verbesserung der Filtrationsgeschwindigkeit war das Ziel weiterer Versuche.

Natürliche Cellulose hat aufgrund einer geringen Anzahl von Carboxylgruppen geringe Ionenaustauscheigenschaften.

Die Kombination von in Aqu.dest. aufgeschlemmter Cellulose in Form von Cellulosepulver² als Auflockermittel mit dem Adsorbens Hydroxylapatit brachte die gewünschte Steigerung der Filtrationsrate, an der vielfach gesteigerten Tropfgeschwindigkeit der Säulen kenntlich.

Beim Schütten dieser Hydroxylapatit-Cellulose-Mischung im Volumenverhältnis 1 : 1 war genau darauf zu achten, daß keine Entmischung des schwereren Hydroxylapatits und der Cellulose beim Absetzen eintrat. Deshalb wurden die Säulen in kleinen Portionen geschüttet!

Die Zunahme der Reinheit der Präparate war ebenso groß wie bei Verwendung von reinen Hydroxylapatit, nämlich von 100 μ g Protein/1 KE auf ca 5,7 μ g Protein/1 KE bei einem Säulendurchgang; nach Einarbeitung ergab sich eine konstante Reinheit von 2,4 - 2,8 μ g Protein/1 KE bei einem Säulendurchgang. Die Ausbeute betrug 75 %. Beim Waschen der Hydroxylapatit-Cellulose-Säule mit 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, kommt es zum Auftreten eines deutlichen Vorpeaks bei Adsorption bei 260 m μ (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 4). Dem anfänglichen Austreten von Farbstoffen ohne Auftreten von Proteinen im Waschdurchlauf folgte ein starkes Ansteigen der Konzentration von Eiweiß im Waschdurchlauf, ohne daß zuerst bedeutende Kallikreinaktivität darin nachzuweisen war.

Genauere Untersuchungen über die Reihenfolge der Phasen bei der Elution, vor allem die Lage des Vorpeaks (s. Versuche

und Ergebnisse: Versuchsschema 5) zeigten, daß den Farbstoffen drei Proteinzonen folgten, deren erste sich mit den Farbstoffzonen überschneidet - ebenso wie auch bei Verwendung von reinem Hydroxylapatit -. Die letzte farblose Proteinzone brachte zu Anfang den erwähnten Vorpeak. (Siehe Abbildung 4)

	Farbe	Gesamt-KE	μg Protein/KE
1. Proteinzone	braun	200	700
2. Proteinzone	bräunlich-gelb	8 000	130
3. Proteinzone	farblos	2 000	50

Abbildung 4

Versuche mit 0,02 M, 0,04 M und 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, um damit eine möglichst vollständige Abtrennung von Fremdproteinen zu erreichen, brachte weder einen bemerkenswerten Anstieg der Proteinkonzentration noch der Kallikreinaktivität im Waschdurchlauf.

Danach war deutlich, daß durch die Zugabe des Cellulosepulvers das Adsorptionschromatogram des Hydroxylapatits nicht entscheidend verändert wurde, wenn auch die Filtrationsrate eine beträchtliche Zunahme erfuhr.

c) Rechromatographie

Eine erste Rechromatographie des Pankreaskallikreins an Hydroxylapatitcellulose ergab, daß noch eine weitere Reinigung erzielt werden kann. Die Elution mit 0,01 M bis 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffergradienten, pH 6,8, ergab bei 90 %iger Ausbeute eine Zunahme der Reinheit von 2,8 μg Protein/KE auf 1,2 μg Protein/KE (siehe Abbildung 5 und Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 6).

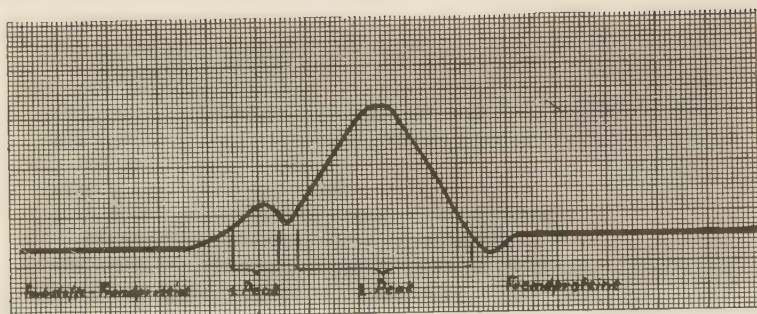


Abbildung 5

Das mit dem Vorpeak eluierte Kallikrein zeigte eine Reinheit von $6,5 \mu\text{g}$ Protein/KE und betrug ca 5 % der eingesetzten Gesamtmenge. Mit dem so erhaltenen Präparat ist durch einfache Adsorptionchromatographie bereits ein Kallikrein-Präparat gewonnen, das in dem bisherigen Verfahren nur mit Hilfe elektrophoretischer Verfahren erhalten werden konnte.

Durch erneute, also zweite Rechromatographie, konnte das Präparat nochmals bis zur optimalen Reinheit von $0,7 \mu\text{g}$ Protein/KE, die durch weitere elektrophoretische Reinigung keine Zunahme mehr erfuhr, gereinigt werden.

d) Diskussion und weitere Reinigungsversuche

Habermann (60) beobachtete 1962 zwar zwei Kallikreine, das sog. Kallikrein A und B, konnte diese Befunde bei Reinigung des Pankreaskallikreins aus Padutin[®] jedoch nicht wiederholen. Dies führte er auf die verschiedenen Voraussetzungen der Autolyse zurück. Nach Trautschold (1965 (6)) soll es sich dabei um Artefakte handeln, die durch Abbau des nativen Moleküls - vor allem im saueren Milieu - entstehen.

Auhagen fand 1966 (61), daß zwei immunoelektrophoretisch verschiedene Pankreaskallikreine vorliegen.

Es ergab sich aus der Reinigung an Hydroxylapatit-Cellulose kein Hinweis auf das Vorliegen verschiedener Pankreaskallikreinfraktionen, wie sie später von Auhagen 1966 (56) nachgewiesen wurden.

Daß auch noch Eiweißabbauprodukte und Fremdproteine mit höherem Molekulargewicht als das Kallikrein im Autolysat vorlagen, zeigten die Reinigungsversuche deutlich. Es kam jeweils nach der Elution des Kallikreins noch zu einem beträchtlichen unspezifischen Anstieg der Eiweißkonzentration im Eluat. Dies weist darauf hin, daß auch andere autolytisch nicht angreifbare Proteine vorlagen; das wesentliche aber, die Abtrennung der anderen Proteinasen der Pankreaszelle mit etwa gleichem Molekulargewicht wie das Kallikrein, in Form niedermolekularer Spaltprodukte, war eindeutig eingetreten.

Das in dem jeweils ersten Reinigungsschritt an Hydroxylapatit-Cellulose zu beobachtende Auftreten eines geringen Nachpeaks (siehe z.B. Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 3, Nachlauf) ließ anfangs vermuten, daß Pankreaskallikrein eine sehr stark gekrümmte Adsorptionsisotherme an Hydroxylapatit zeigt. Dieser Schwanz ließe sich dann so erklären, daß bei stark gegen die Sättigungskonzentration gekrümmter Adsorptionsisotherme die Zonenrückfronten stark verschmiert sind, da die beim Eluieren zurückbleibenden Anteile infolge geringerer Konzentration relativ stärker adsorbiert werden, als die in hoher Konzentration Voraneilenden. Der äußerst geringe Anteil des Nachpeak-Kallikreins sowie das Fehlen von Nachpeaks bei der ersten und zweiten Rechromatographie aber spricht eindeutig dafür, daß es zu einer scharfen Begrenzung der Zone kommt.

Nebenher liefen Versuche mit dem Ziel, durch eine Säule aus an PAB-Cellulose gebundenen Trasylol die Reinigung noch mehr zu vereinfachen. Der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor Trasylol führt über die Bildung eines Kallikrein-Trasylol-Komplexes zur Hemmung der proteolytischen und esterolytischen Aktivität des Kallikreins. Die Bildung des Komplexes ist pH-abhängig und reversibel; so liegt bei pH 5,0 schon die Hälfte der Reaktionspartner in freier Form vor, bei pH 4,0 ist der Kallikrein-Inhibitor-Komplex bereits völlig dissoziiert. - Es gelang, das Trasylol durch Azokupplung an PAB-Cellulose zu binden; ebenfalls kam es in der Säule zur Bindung des Kallikreins an das Trasylol. Der Komplex des Kallikreins mit dem säulengebundenen Inhibitor ergab aber eine derartig irreversible Bindung, daß Elution durch pH-Senkung mit 0,1 n- Kochsalz-haltigen Puffern

bis pH 3,0 nur minimale Ausbeuten an Kallikrein, ca 6 %, erlaubte.

In einem mit langfaseriger Cellulose gemischten Hydroxylapatit³ wurde später ein industrieller Hydroxylapatit gefunden, der die gleichen hervorragenden Eigenschaften zur Reinigung von Pankreaskallikrein aufweist (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 7).

Die Konstanz der Versuchsausbeuten und der Reinheit der Präparate sowie die gleiche Verwendbarkeit des Hydroxylapatits (n.Tiselius) und der Hydroxylapatit-Cellulose³ wird aus den weiteren Versuchsschemata unter Versuchsschema 8 (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 8) deutlich.

3. Gesamtablauf der Reindarstellung

a) Protaminsulfatfällung

Da die Pankreaskallikrein-Suspension neben den Fremdproteinen und Farbstoffen durch Nucleinsäuren stark verunreinigt war, mußten diese durch Komplexbildung mit Protaminsulfat gefällt und abzentrifugiert werden. Denn, wie bereits erwähnt, adsorbiert Hydroxylapatit auch Nucleinsäuren. Das überschüssige Protaminsulfat mit seinem sehr niederen Molekulargewicht von 6 000 wurde bei der folgenden Hydroxylapatit-Cellulose-Reinigung mit den Eiweißspaltprodukten abgetrennt.

b) Hauptschritt der Reinigung durch dreimaligen Durchgang an Hydroxylapatit-Cellulose-Säulen

Der entscheidende Reinigungsschritt erfolgte durch Chromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose-Säulen. Unsere Reindarstellung des Pankreaskallikreins von ca 100 μg Protein/KE bis zu einer maximal möglichen Reinheit von 0,7 μg Protein/KE vollzog sich ausschließlich an der Hydroxylapatit-Cellulose-Säule und erforderte meist einen dreimaligen Durchgang des Präparates. Der erste Schritt brachte nach Waschen mit 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, bei Elution mit 0,1 M Puffer ein 2,4 bis 3,2 μg Protein/KE Präparat in ca. 75 %iger Ausbeute. Eine erste Rechromatographie nach 24-stündiger Dialyse bei 0°C steigerte den Rein-

heitsgrad nach Puffergradientelution von 0,01 bis 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, auf 1,1 bis 1,7 μg Protein/KE; die Ausbeute betrug 80 bis 85 %. Bei einer zweiten Rechromatographie unter gleichen Bedingungen wie die erste Rechromatographie ergab sich eine 85 %ige Gesamtausbeute und wenn man die reinste Fraktion verwendete, ein 0,7 μg Protein/KE-Präparat in 75 %iger Ausbeute.

c) Entsalzen über Sephadex G-25

Entsalzen über Sephadex G-25 brachte keine Zunahme der spezifischen Aktivität. Die Ausbeute dabei war quantitativ. Das so erhaltene Pankreaskallikreinpräparat zeigte eine spezifische Aktivität von 1 428,5 KE/mg Protein, entsprechend 0,7 μg Protein/KE und einer Einwaage von 1,04 μg Substanz/KE.

Den folgenden Untersuchungen einiger Reinheitskriterien etwas vorausgreifend sei gesagt, daß eine präparative elektrophoretische Reinigung weder die spezifische Aktivität noch die Einwaage erhöhen konnte. Somit ist allein durch Reindarstellung an Hydroxylapatit-Cellulose eine optimale Reinigung erreicht. (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 9)

Nach diesem hier vorgelegten Schema wurde über 1 g reinstes Schweinepankreasallikrein hergestellt. Nach Lyophilisieren wurden die Präparate bei -15°C aufbewahrt.

4. Untersuchung verschiedener Reinheitskriterien

a) Elektrophoretische Untersuchungen

Zur Prüfung der Reinheit wurden membranelektrophoretisch analytische Untersuchungen hinsichtlich

α) von Fremdproteinen

β) von verunreinigenden Zuckern

durchgeführt.

α) Fremdproteine

Bei Verwendung von Celluloseacetatfolien⁴ und 0,01 M Boratpuffer, pH 8,0, einer Laufzeit von 4,5 Stunden und

3,6 V/cm bei 3-5 mA zeigten verschiedene Pankreaskallikreinchargen die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit. (siehe Abbildung 6 und Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 10) Daneben fanden sich bei Anfärbung mit Amidoschwarz keine weiteren Zonen.

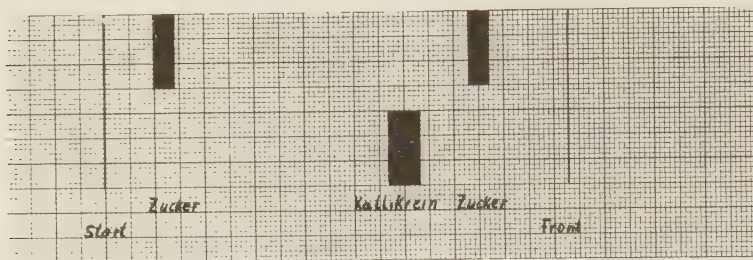


Abbildung 6

Eine Charge wies dagegen eine sehr schwach bläulich gefärbte, aber doch deutliche Schmierzone nach dem Start auf.

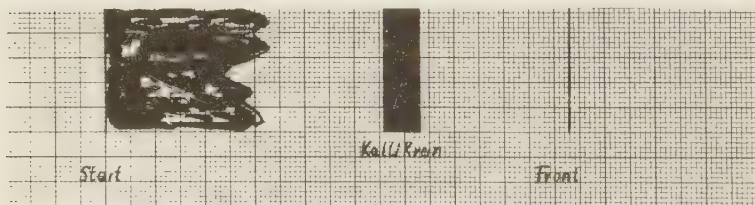


Abbildung 7

Die Frage, ob es sich hier um verunreinigende Fremdproteine oder artefiziell entstandene Denaturierungsprodukte handelte, konnte im letzteren Sinn entschieden werden. Denn das Elektropherogramm nach vorsichtiger Denaturierung des Kallikreins mit Ameisensäure (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 11) zeigte dieselbe startnahe Proteinzone in deutlicher Verstärkung.

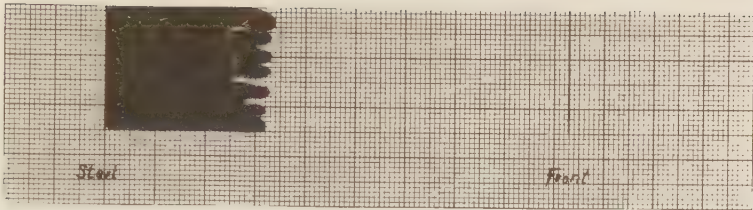


Abbildung 8

Es waren zwar Hinweise für das Vorhandensein von 2 Kallikreinen da, da alle Chargen in der Proteinzone selbst eine leichte Aufhellung zeigten. Dies konnte aber nicht mit Sicherheit verifiziert werden. Das Präparat ist also unter obigen Bedingungen sowie bei weiteren Versuchen mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0, einer Laufzeit von 5 Stunden und 3,6 V/cm bei 3-5 mA (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 12) membranelektrophoretisch einheitlich.

β) Verunreinigende Zucker

Die Untersuchung auf verunreinigende Zucker nach elektrophoretischer "Auftrennung" des reinen Pankreaskallikreins wurde durch Anfärben des El.phor.-Streifens mit Bromphenolblau durchgeführt. Dabei zeigten sich zwei schmale leicht bräunliche Zonen (siehe Abbildung 6), bei 0,01 M Boratpuffer, pH 8,0, einer Laufzeit von 4,5 Stunden und 3,6 V/cm bei 3-5 mA.

Zur Klarstellung, ob die Reinheit nach Einwaage bei dem Pankreaskallikreinpräparat durch die festgestellten Anteile verunreinigender Zucker wesentlich beeinflusst wird, wurde eine präparative el.-phor.Reinigung einer Pankreaskallikreincharge durchgeführt.

b) Präparative elektrophoretische Reinigung von Pankreas-
kallikrein zum Vergleich der Reinheit mit nicht elektro-
phoretisch präparativ behandeltem Pankreaskallikrein

Bei der Elution der entsprechenden Proteinzonen aus den Celluloseacetatfolien mit 0,1 %iger NaCl-Lösung trat - wie auch bei der el.-phor. Endreinigung des bisher bekannten Reinigungs-
verfahrens nach Trautschold (5) - ein großer Verlust, fast 60 %, ein (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 13).
Nach Entsalzen über Sephadex G-25 und Lyophilisieren zeigte das Präparat eine Einwaage von 1,06 μ g Substanz/1 KE bei 0,7 μ g Protein/1 KE.

Im Vergleich zu den Pankreaskallikreinpräparaten unmittelbar nach der zweiten Rechromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose-Säulen, Entsalzen über Sephadex G-25 und Lyophilisieren zeigten diese Präparate nach zusätzlicher el.-phor. Endreinigung weder eine Zunahme der Reinheit nach Einwaage noch der spezifischen Aktivität. (siehe Abbildung 9)

Kallikrein vor bzw. nach el.-phor.Endrei- nigung	μ g Protein/1 KE	spez.Akt. μ g Sub- KE/mg Pro- stanz/KE tein
vor	0,7	1 428,5
nach	0,7	1 428,5

1,04
1,06

Abbildung 9

Die Ergebnisse der Analyse des von uns gereinigten Pankreas-
kallikreins bestätigten klar, daß schon allein durch die
Hydroxylapatit-Adsorption die optimale Reinigung des Pankreas-
kallikreins erreicht wird; denn die Summe der prozentualen
Zusammensetzung entspricht genau der Beziehung von Reinheit
nach Biuret und Einwaage: 70 % Protein, 20 % Zuckergehalt (al-
so gebunden, nicht verunreinigend), 9 % H₂O, 1,4 % Verunrei-
nigungen.

Dies beweist eindeutig die optimale Reinheit des an Hydroxyl-
apatit gereinigten Kallikreins. - Eine elektrophoretische End-
reinigung ist somit nicht nötig.

Die geringfügige Zunahme der Einwaage darf auf technische
Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Einwaage zurückgeführt

werden, da das gefriergetrocknete Pankreaskallikreinpräparat sehr hygroskopisch ist.

c) Bestimmung der Amino-endständigen Aminosäure durch Edmann-Abbau und Dünnschichtchromatographie

Für den Fall des Vorliegens von Cysteinresten im Pankreaskallikreinmolekül wurde das Präparat zuerst mit Perameisensäure behandelt (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 14). Zur Bestimmung der Amino-endständigen Aminosäure wurde die Methode nach Edman mit Cyclisierung der Amino-endständigen Aminosäure durch Phenylisothiocyanat verwendet (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 15).

Die in Essigsäureäthylester aufgenommene Phenylthiocarbamylaminosäure wurde dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel GF 425 bestimmt. Bei Verwendung von Chloroform/Heptansystem und Chloroform-Methanol/Chloroform-Ameisensäure als Fließmittel bei der zweidimensionalen Chromatographie wurde die abgespaltene Phenylthiocarbamylaminosäure in beiden Fällen als Alanin identifiziert (siehe Abbildungen 10 und 11 und Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 16).

Daß sich nur eine einzige Amino-endständige Aminosäure, Alanin, vorfand, ist ein weiteres Zeichen der optimalen Reinheit des Pankreaskallikreinpräparates.

5. Bestimmung der $K_{m_{\text{BAEE}}}$ für Pankreaskallikrein am Autotitrator

Die nach Burk - Lineweaver bestimmte $K_{m_{\text{BAEE}}}$ ist auffallend hoch und bewegt sich zwischen $K_{m_{\text{BAEE}}} = 4,23 \times 10^{-4} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right]$ und $3,78 \times 10^{-4} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right]$. Das bedeutet, daß eine hohe Konzentration von BAEE benötigt wird, um Halbsättigung des Pankreaskallikreins mit BAEE zu erreichen. Die Affinität des Pankreaskallikreins zum BAEE ist folglich nicht sehr groß (siehe Versuche und Ergebnisse: Versuchsschema 17 und 18 und Abbildungen 12, 13).

V. Versuche und Ergebnisse

Versuchsschema 1

<u>Versuchsabsicht:</u>	Reinigung von Pankreaskallikrein an Hydroxylapatit-Cellulose-Säulen, die in 0,001 M Phosphat-Puffer aufgeschlemmt sind.
<u>Ausgangsmaterial:</u>	Gesamtaktivität: 200 000 KE Reinheitsgrad: ca 100 μ g Protein/KE
<u>Versuchsablauf:</u>	4 Hydroxylapatitsäulen
<u>Versuchsergebnis:</u>	130 000 KE direkt oder beim ersten Waschen mit 0,01 M Phosphatpuffer durchgelaufen, 30 000 KE eluiert. 20 % Verlust, keine Reinigung

Versuchsschema 2

<u>Versuchsabsicht:</u>	Herstellung von Hydroxylapatit nach Tiselius.
<u>Versuchsablauf:</u>	2 l 0,5 M CaCl_2 und 2 l 0,5 M Na_2HPO_4 tropfen - ca 120 Tropfen/min - von 2 getrennten Behältern unter Rühren in einen Behälter. Nach Beendigung wird vom abgesetzten Präzipitat dekantiert. Das Präzipitat wird mit Aqu.dest. gewaschen. Nach Auffüllen mit Aqu.dest. auf 4 l wird 100 ml frisch zubereitete Lösung von 40 %iger NaOH zugegeben. Dieses Gemisch wird eine Stunde unter Rühren gekocht. Wenn sich das Präzipitat bis auf das am feinsten verteilte Präzipitat abgesetzt hat, wird dekantiert und erneut 4 mal mit Aqu.dest. gewaschen. Nach Auffüllen des Präzipitates mit 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, auf 4 l

wird die Lösung solange erhitzt, bis sie beinahe zu kochen anfängt. In dieser Phase ist unbedingt darauf zu achten, daß die Lösung nicht wirklich kocht.

Nach erneutem Dekantieren wird mit demselben Puffer die Lösung nur 5 min. gekocht. Anschließend wird nach Dekantieren und nochmaliger Zugabe von 0,01 M Puffer 1 mal 15 min. gekocht; mit zweimaligem 15 minütigem Kochen des Präzipitates in 0,001 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, ist die Synthese abgeschlossen.

V Versuchsergebnis:

Hydroxylapatit, grobkörnig, der in 0,001 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, aufbewahrt wird.

V Versuchsschema 3:

V Versuchsabsicht:

Untersuchung der Adsorption von Pankreaskallikrein an Hydroxylapatit (nach Tiselius) und deren Reversibilität.

V Versuchsanordnung:

Mit dem in 0,001 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, aufgeschlemmten Hydroxylapatit eine 2 cm $\varnothing$. 10 cm Säule geschüttet.

V Ausgangsmaterial:

Gesamt-KE: 18 471

Gesamt-Protein: ca 1 900 mg, da 65,5 ml zu 282 KE/ml.

Reinheit: 100 μg Protein/KE

V Versuchsablauf:

Auftragen: mit Saugstrahlvakuum über 20 Stunden.

Waschen: Nach 4 Stunden Waschen mit 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8

a) Beginn der Abtrennung der Farbstoffe in 3 Zonen ohne Auftreten von Eiweiß oder Kallikrein im Eluat.

Nach weiteren 4 Stunden:

- b) Abtrennung des Fremdproteins; sich mit der dritten Farbzone etwas überschneidend.

Elution: Da nicht so sehr die absolute Reinigung des Pankreaskallikreins hier beabsichtigt ist, vielmehr die prinzipielle Verwertbarkeit des Hydroxylapatits untersucht wird, wird nach 12 Stunden mit 0,5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8 eluiert.

<u>Versuchsergebnis:</u>	<u>Δ E/3 ml/10 min</u>	<u>KE/ml</u>	<u>ml</u>	<u>KE gesamt</u>
	0,172	156	5,0	780
	0,041	370	27,5	10 175
	0,114	104	25,0	2 600
	0,007	6,3	21,0	<u>132,3</u>
				13 627,3
				=====
Nachlauf	0,011	ca 1	102,0	102
Gesamtübersicht über Ausbeute siehe Seite 32				

Versuchsschema 4:

Versuchsabsicht: Zur Erhöhung der Tropfgeschwindigkeit wird Hydroxylapatit (nach Tiselius) mit Cellulose-Pulver im Vol.-Verhältnis 1 : 1 versetzt.

Versuchsanordnung: 2 Hydroxylapatit-Cellulose-Säulen je 3,0 cm Ø x 12 cm.

Ausgangsmaterial: Gesamt-KE: 135 000 KE
Gesamt-Protein: 13 g
Reinheit: 100 µg Protein/KE

Versuchsablauf: Die Säulen werden mit 0,001 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, äquilibriert.
Auftragen ohne Vakuum ca 3 Stunden.

Waschen: 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8,

- a) zuerst Farbstoffe, ohne Auftreten von Eiweiß oder Kallikrein im Eluat.
- b) Abtrennung der Fremdproteine. In dieser Zone findet sich ein kurzer Pankreaskallikrein-Vorpeak mit 12 000 KE.

Eluieren: 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8.

V Versuchsergebnis:

Gesamt-KE: 112 000 KE = 83 %

KE nach Elution: 400 000 KE = 74,1 %

Reinheit: 2,4 μg Protein/KE.

Nach 24 Stunden Dialyse gegen 2 x 10 l Aqu.dest. bei 0°C und Lyophilisieren erfolgt Aufbewahrung bei -15°C.

V Versuchsschema 5:

V Versuchsabsicht:

Es soll

- a) der Pankreaskallikrein-Vorpeak
 - b) die Möglichkeit durch Waschpufferkonzentrationserhöhung eine möglichst vollständige Abtrennung der Fremdproteine zu erreichen
- untersucht werden.

V Versuchsanordnung:

1 Hydroxylapatit-Cellulose-Säule

V Ausgangsmaterial:

Gesamt-KE: 53 000 KE

Gesamt-Protein: ca 5 g

Reinheit: 100 μg Protein/KE

V Versuchsablauf:

Nach 8-stündigem Waschen ist folgende Fraktionierung im Waschpuffer beendet:

Waschen: 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8; nach einer Farbstoffzone ohne Eiweiß kommen 3 Proteinzone.

Siehe Schema Seite 34

0,02 M: weder bedeutender Eiweiß- noch Kallikreinkonzentrationsanstieg.

0,04 M; 0,05M: gleiches Ergebnis wie bei 0,02 M.

Eluieren: 0,5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8.

V Versuchsergebnis:

Gesamt-KE: 35 000 KE

KE nach Elution: 25 000

Reinheit: 5,7 μg Protein/KE

Gesamtausbeute: 67 %

Dialyse gegen 2 x 10 l Aqu.dest.,

Lyophilisieren und Aufbewahrung bei -15°C .

V Versuchsschema 6:

V Versuchsabsicht:

Untersuchung, ob durch Rechromatographie noch eine weitere Reinigung mit Hydroxylapatit-Cellulose erreicht werden kann.

V Versuchsanordnung:

Hydroxylapatit-Cellulose-Säule (nach Tiselius) 1 cm $\varnothing$ x 7 cm.

V Ausgangsmaterial:

Gesamt-KE: 6 000 KE

Reinheit: 2,8 μg Protein/KE

V Versuchsablauf:

Waschen: 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8. Zuerst Austreten von Farbstoffen, dann zunehmend Fremdproteine, mit kleinem Vorpeak.

Elution: 0,01 bis 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffergradient, pH 6,8.

Versuchsergebnis:

Siehe Abbildung 5

Gesamt-KE: 5 700 KE = 95 %

KE nach Elution: 5 400 KE = 90 %

Reinheit: 1,2 μ g Protein/KE

300 KE (Vorpeak):

6,5 g Protein/KE

Dialyse bei 0°C gegen 10 l Aqu.dest.,

Lyophilisieren und Aufbewahrung bei

-15°C.

Versuchsschema 7:

Versuchsabsicht:

Testung von Cellulose-Pulver³, MN 2100,
Apatit-50 fein, Macherey, Nagel zur
Reinigung von Pankreaskallikrein.

Versuchsanordnung:

1 Säule s. oben, 3 cm $\varnothing$ x 12 cm

Ausgangsmaterial:

Gesamt-KE: 60 000

Reinheit: ca 100 μ g Protein/KE

Versuchsablauf:

Waschen: 0,001 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer,
pH 6,8.

Eluieren: 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer,
pH 6,8.

Versuchsergebnis:

Gesamt-KE: 46 800 = 76,8 %

Reinheit: 2,8 g Protein/KE

Dialyse gegen 2 x 10 l Aqu.dest. bei
0°C, Lyophilisieren und Aufbewahrung
bei -15°C.

Versuchsschema 8:

Siehe zum Vergleich auch Versuchsschemata 4, 5, 6 und 7.

Verwendeter HAP	HAP (n.Tis.)-Cell.	HAP (n.Tis.)-Cell.	HAP (n.Tis.)+ Cell.Pulver	Cell.Pulver ³	Cell.Pul ³	Cell.Pul ³
Versuchsanordnung: Ausgangsmaterial: Reinheit μ g Protein/KE	4 Säulen Gesamt-KE: 960000 KE ca 90	2 Säulen 200000 KE 90	1 Säule 120 000 KE 1,7	1 Säule 120 000 KE 2,2	5 Säulen 350000 KE 2,4	1 Säule 100000 KE 1,2
Versuchsablauf: Waschen: Phosphat- Puffer Eluieren: Phosphat- Puffer	0,001 M 0,1 M	0,001 M 0,1 M	0,01 M 0,01-0,1 M Puffergradient	0,01 M 0,01-0,1 M Puffergradient	0,01 M 0,01-0,1 M Gradient	0,01 M 0,01-0,1 M Gradient
1 2 3 4 5 6 Versuchsergebnis: Reinheit der reinsten Fraktion KE der reinsten Fraktion Ausbeute % Gesamt-KE	3,28 μ g Prot/KE 630 000 68 770 000 (140000 KE mit 10,1 μ g Prot/KE)	2,8 μ g Prot/KE 153 000 76,1 173 000	0,9 104 000 87	1,1 100 000 83	1,1 276 000 79	0,7 72 000 72 83 000 (11000 KE mit 5,7 μ g Prot/KE)
Gesamt-Ausbeute %	80,2	85				83

Versuchsschema 9:

Arbeitsschritt	Spez. Aktivität (KE/mg Protein)	Ausbeute %	Anreicherung	jeweilige Ausbeute %
Pankreaskallikrein-Suspension (Ausgangsmaterial)	10			
Protaminsulfatfällung, Dialyse, Lyophilisieren	10	100	0	100
1. Reinigung an Hydroxylapatit-Cellulose, Dialyse, Lyophilisieren	312 - 416	75	31 - 41	75
2. Reinigung an Hydroxylapatit-Cellulose, Dialyse, Lyophilisieren	600 - 909	64	60 - 91	80 - 85
3. Reinigung an Hydroxylapatit-Cellulose, Dialyse, Lyophilisieren	1 428,5	48	142,7	75 bzw. 85
Sephadex G-25, Lyophilisieren	1 428,5	48	142,7	100

Versuchsschema 10:

Versuchsabsicht:

- a) Elektrophoretischer Vergleich von 3 Chargen reinstes Pankreaskallikrein
- b) Untersuchung auf Fremdproteine

Versuchsanordnung:

Celluloseacetatfolien⁴
 Puffer: 0,01 M Boratpuffer, pH 8,0
 U: 3,6 V/cm (200 V bei 27,7 cm)
 I: 3 - 5 mA

Ausgangsmaterial: je 100 μ g Kallikrein auf jede Folie

Versuchsablauf: 4,5 Stunden Laufzeit
Färbung: 5 %ige Amidoschwarzlösung
(in Methanol techn. - Eisessig 9 : 1)
Entdifferenzierungsbad: Methanol-
Eisessig 9 : 1

V Versuchsergebnis: Siehe Seite 39

Versuchsschema 11

Versuchsabsicht: Untersuchung, ob sich durch vorsichti-
ge Denaturierung mit Ameisensäure die
startnahe Schmierzone hervorrufen und
verstärken läßt.

Versuchsanordnung: Celluloseacetatfolien⁴
Puffer: 0,01 M Boratpuffer, pH 8,0
U: 3,6 V/cm (200 V bei 27,7 cm)
I: 3 - 5 mA

Ausgangsmaterial: je 50 μ g Kallikrein
a) eines Ameisensäure vorbehandelten
Pankreaskallikreinpräparates sowie
b) eines nicht veränderten Pankreas-
kallikreins
auf je 1 Folie

Versuchsablauf: Laufzeit: 5 Stunden
Färbung: 5 %ige Amidoschwarzlösung
(in Methanol-Eisessig 9 : 1)
Entdifferenzierungsbad: Methanol-Eis-
essig 9 : 1

V Versuchsergebnis: Siehe Seite 39

Versuchsschema 12:

- Versuchsabsicht: Untersuchung auf Fremdprotein bei veränderten Bedingungen im Vergleich zu Versuchsschema 10
- Versuchsanordnung: Celluloseacetatfolien⁴
Puffer: 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0
U: 3,6 V/cm (200 V bei 27,7 cm)
I: 3 - 5 mA
- Ausgangsmaterial: 50 μ g Kallikrein auf eine Folie
- Versuchsablauf: Laufzeit: 5 Stunden
Färbung: 5 %ige Amidoschwarz (in Methanoleisessig 9 : 1)
Entdifferenzierungsbad: Methanol-Eisessig 9 : 1
- V Versuchsergebnis: Das aufgetragene Präparat ist membran-elektrophoretisch einheitlich

Versuchsschema 13:

- Versuchsabsicht: Untersuchung, ob durch zusätzliche elektrophoretische Endreinigung - wegen geringster Mengen verunreinigender Zucker - die Reinheit der Pankreas-kallikreinpräparate erhöht werden kann; es sollen die zwei Zuckerzonen abgetrennt werden.
- Versuchsanordnung: Celluloseacetatfolien
Puffer: 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0
U: 3,6 V/cm (200 V bei 27,7 cm)
I: 2 Becken 1,5 mA, 2 Becken 2,5 mA
- Ausgangsmaterial: ca 10 mg salzfreies, lyophilisiertes Kallikrein in 4ml H₂O gelöst

Versuchsablauf:

Laufzeit: 2,5 Stunden

Die ausgeschnittenen Proteinzonen werden mit 0,1 %iger NaCl-Lösung in 15 ml Eluat eluiert.

Versuchsergebnis:

Nach Entsalzen über Sephadex G-25 und Lyophilisieren werden knapp 4 mg Pankreaskallikrein erhalten. Ergebnisse siehe Seite 41

Versuchsschema 14:

Versuchsabsicht:

Behandlung eines Pankreaskallikreinpräparates mit Perameisensäure.

Ausgangsmaterial:

7 mg reinstes Pankreaskallikrein
(Reinheit 0,7 g Protein/KE)

Versuchsanordnung:

9,5 ml 99 %ige Ameisensäure werden mit 0,5 ml 30 %igem H_2O_2 gut gemischt und bei Raumtemperatur 90 min stehen gelassen.

Versuchsablauf:

Das Pankreaskallikreinpräparat wird mit 0,5 ml dieser Perameisensäurelösung aufgenommen. 2 Stunden bei $-3^{\circ}C$ inkubieren, dann wird die 10-fache Menge Aqu.dest. hinzugegeben. Im Rotationsverdampfer wird das Präparat zur Trockne gebracht. Dieses Abdampfen der immer wieder in Aqu.dest. gelösten Perameisensäure wird mehrmals wiederholt.

Versuchsergebnis:

Siehe Versuchsschema 15

Versuchsschema 15:

Versuchsabsicht:

Bestimmung der Amino-endständigen Aminosäure durch Edman-Abbau.

Versuchsablauf:

1. Bildung der Phenylthiocarbamyl-aminosäure:

6 - 7 mg Kallikrein werden aus der Trockne mit 2 ml 66 %igem Pyridin aufgenommen.

Pankreaskallikrein löst sich schnell und vollständig darin. Es wird nun unter Lichtausschluß mit 0,08 ml Phenylisothiocyanat versetzt, gut gemischt und 2 Std. bei 37° C inkubiert. Nach Einengen bis zur Trockne im Rotationsverdampfer wird das überschüssige Phenylsenföhl an der Ölpumpe sublimiert.

Das Phenylthiocarbamylpeptid wird in 5 ml Trifluoressigsäure aufgenommen, gut gemischt und bei 20° C 4 Stunden inkubiert. Im Wasserstrahlvakuum eingeengt, wird aus dem Präparat die überschüssige Trifluoressigsäure im Exsikkator über KOH entfernt.

2. Extraktion der Phenylthiocarbamyl-aminosäure

Mit Essigsäureäthylester wird die durch Aufnehmen des im Exsikkator getrockneten Präparates mit 3 ml Aqu.dest. entstandene Lösung versetzt. Nach gutem Schütteln tritt nach einiger Zeit eine Phasentrennung ein. Durch Abpipettieren der oberen, die Phenylthiocarbamylaminosäure enthaltenden Esterphase wird

diese von dem in der wässrigen Phase
gelegenen Restpaptid abgetrennt.

Versuchsergebnis:

Die Amino-endständige Aminosäure liegt
nun als Phenylthiocarbamylaminosäure
vor.

Versuchsschema 16:

Versuchsabsicht:

Dünnschichtchromatographische Bestim-
mung der in Versuchsschema 15 erhalte-
nen Phenylthiocarbamylaminosäure.

Versuchsanordnung:

Die Dünnschichtchromatographieplatten
werden mit Kieselgel GF 425 gegossen.
Fließmittel für die Platten I:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Chloroform | 100 ml |
| 2. Heptan-System | 90 ml-30 ml- |
| (n-Heptan-Äthylen-
chlorid-Ameisensäure-
Propionsäure) | 21 ml-18 ml |

Fließmittel für die Platten II:

- | | |
|-----------------------------------|---------------|
| 3. Chloroform + Methanol | 90 ml + 10 ml |
| 4. Chloroform + Ameisen-
säure | 100 ml + 5 ml |

Die Aminosäuren - Vergleichslösung ent-
hält:

Phe, Ala, Gly, Thre.

Zum Anfärben: 160 ml o-Tolidin + 3 ml
Eisessig, mit Aqu.dest. auf 0,5 l auf-
füllen, plus 1 g KJ.

Versuchsablauf:

Über Wärme wird der Essigsäureäthylester
etwas abgedampft. Die Phenylthiocar-
bamylaminosäure-Lösung und die Amino-
säuren-Vergleichs-Lösung werden mit
Glasstäbchen auf die Platten aufge-
bracht.

Lauf der Fließmittel 1. und 2. bei den Platten I bis zur Front von 10 cm.

Lauf der Fließmittel 3. und 4. bei den Platten II bis zur Front von 15 cm.

Anfärbung mit: o-Tolidin-Eisessig-KJ.

V Versuchsergebnis:

Die Phenylthiocarbamylaminosäure zeigt einen Rf von 102/58,5 bei Fließmittel 1., 2. (15 cm Front) 16/11 bei Fließmittel 3., 4. (10 cm Front).

Dies ergibt nach der Rf-Tabelle für PTH-AS (Stahl 1962 (62)) als Aminoendständige Aminosäure Alanin. Siehe die Dünnschichtchromatogramme Seite 62, 63

V Versuchsschema 17:

V Versuchsabsicht:

Bestimmung der K_m für Pankreas-kallikrein am Autotitrator.

V Versuchsanordnung:

1. Der Autotitrator wird für die Spaltreaktion auf einen Fest-pH von 7,8 eingestellt.
2. n/100 NaOH
3. BAEE-Lösung:
4 mg BAEE/1 ml 1 %ige NaCl-Lösung
4. Kallikrein-Lösung:
5 KE/0,1 ml Lösung

Versuchsablauf:

Bei allen 8 Testen Lauf 10

Test	Enzym ml	Einsatz in ml BAEE- Lösung	1 % NaCl	mg BAEE/ 1 ml Einsatz	pH-Änderung n.KKR-Zugabe	Titrier- menge n/100 NaOH
1	0,1	1,00	0	4	pH 3,75 → 7,8	0,0561
2	0,1	0,75	0,25	3	3,88 7,8	0,0431
3	0,1	0,5	0,5	2	4,0 7,8	0,0297
4	0,1	0,25	0,75	1	4,35 7,8	0,015
5	0,1	0,175	0,825	0,5	4,6 7,8	0,0129
6	0,1	0,1	0,9	0,4	4,82 7,8	0,0091
7	0,1	0,05	0,95	0,2	5,1 7,8	0,006
8	0,1	0,025	0,975	0,1	5,4 7,8	0,005

Versuchsergebnis:

1 cm Höhe = 0,1006 ml n/100 NaOH

Test	nach 10 cm Höhe d. Verlängerung d. Anfangsgeschw. cm	äqu. Titrier- menge ml n/100 NaOH	1/BAEE mg	1/ml n/100 NaOH	mg BAEE 1 ml
1	3,80	0,38228	0,25	2,61	4
2	3,75	0,37725	0,33	2,65	3
3	3,70	0,37224	0,50	2,70	2
4	3,40	0,34204	1,00	2,92	1
5	3,15	0,31689	2,00	3,16	0,5
6	2,94	0,29576	2,50	3,38	0,4
7	2,25	0,22635	5,00	4,41	0,2
8	1,60	0,16139	10,00	6,20	0,1

Siehe Abbildung 12: Graphische Darstellung nach Lineweaver-Burk

Berechnung:

$$-1/K_m \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg}} \right] = -6,85; \quad K_m \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = 1/6,85 = 0,145$$

Umrechnung in Mol/l

$$0,145 : 342,6 = 0,000423 \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right]$$

$$K_m = 4,23 \times 10^{-4} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right]$$

Versuchsschema 18

Versuchsabsicht und Versuchsanordnung wie Versuchsschema 17

Versuchsablauf: Bei allen 9 Testen Lauf 10

Test	Enzym ml	Einsatz in ml BAEE 1	%NaCl	mg BAEE/ml 1 ml Ein- satz	pH-Änderung n.KKR Zugabe	Titrier- menge n/100 NaOH
1	0,1	1,00	0,00	4,0	pH 3,80 7,8	0,057
2	0,1	0,75	0,25	3,0	3,85 7,8	0,0447
3	0,1	0,5	0,5	2,0	4,08 7,8	0,032
4	0,1	0,25	0,75	1,0	4,42 7,8	0,0172
5	0,1	0,175	0,825	0,5	4,6 7,8	0,0119
6	0,1	0,1	0,9	0,4	4,82 7,8	0,0091
7	0,1	0,05	0,95	0,2	5,18 7,8	0,0059
8	0,1	0,025	0,975	0,1	5,45 7,8	0,0049
9	0,1	0,017	0,983	0,0679	5,58 7,8	0,0033

Versuchsergebnis: 1 cm Höhe = 0,1006 ml n/100 NaOH

Test	n.10 cm Laufzeit Höhe d.Verlängg. d.Anfangsgeschw. cm	ml n/100 NaOH	1/mg BAEE	1/ml n/100 NaOH	mg BAEE/ 1 ml
1	3,40	0,34204	0,25	2,92	4,00
2	3,60	0,3622	0,33	2,77	3,00
3	3,50	0,3521	0,50	2,84	2,00
4	3,30	0,33198	1,00	3,019	1,00
5	3,00	0,30180	2,00	3,32	0,50
6	2,95	0,92677	2,50	3,42	0,40
7	2,23	0,22434	5,00	4,45	0,20
8	1,60	0,16096	10,00	6,20	0,10
9	1,30	0,13078	14,87	7,64	0,0679

Siehe Abbildung 13: Graphische Darstellung Lineweaver - Burk

Berechnung:

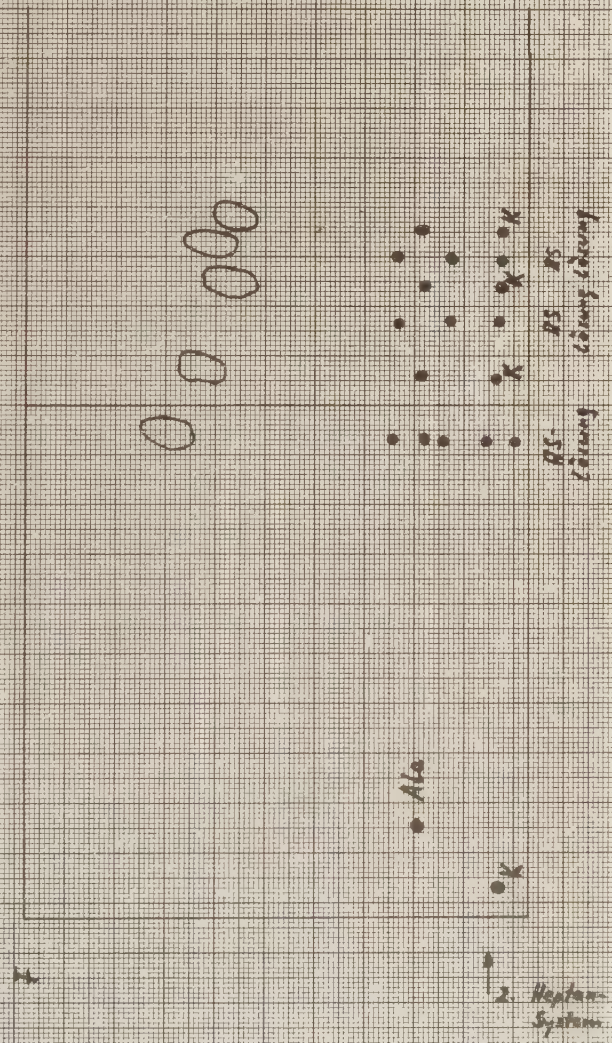
$$-1/K_m \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg}} \right] = 7,78 : K_m \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = 1/778 = 0,128.$$

Umrechnung in Mol/l:

$$0,128 : 342,6 = 0,000378$$

$$K_m = 3,78 \times 10^{-4} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right]$$

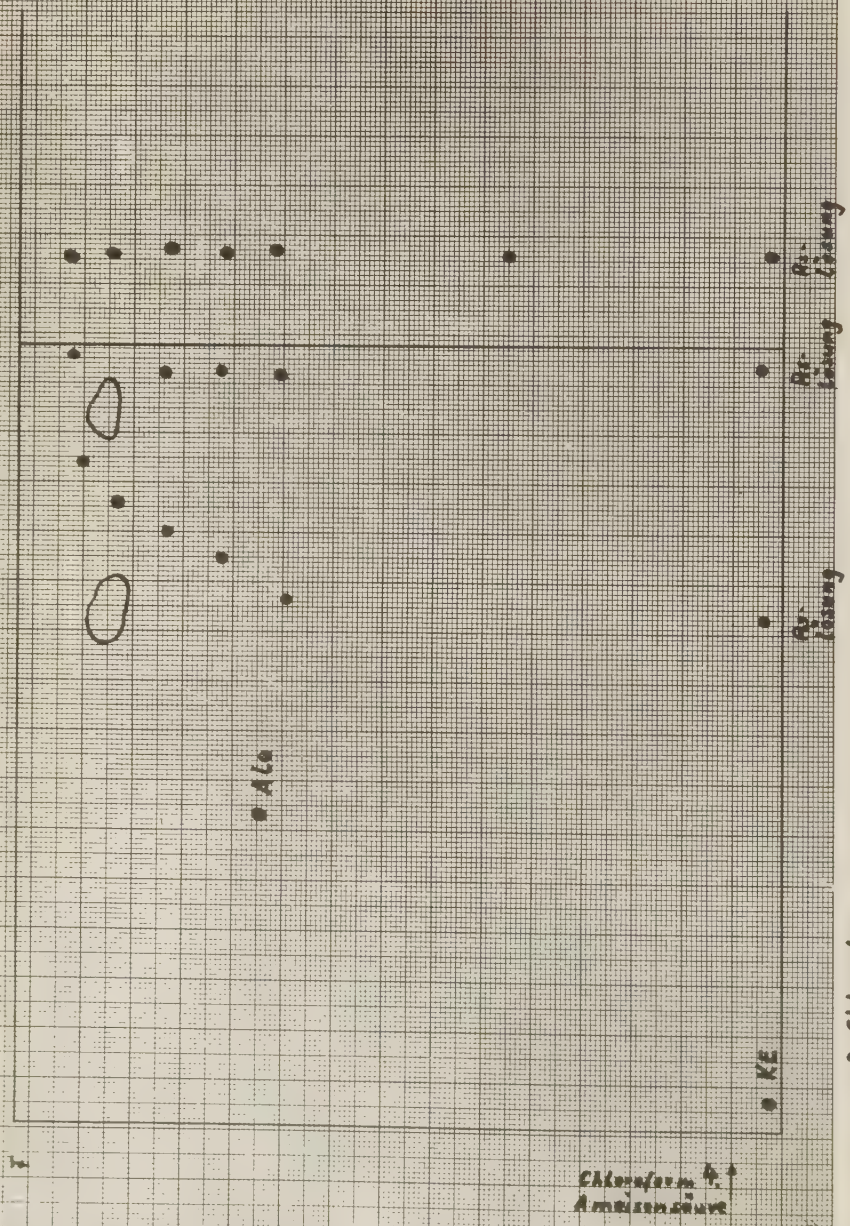
Rf 16/41 bei 70cm Front, Alanin



1. Chloroform

Abbildung 10

84 102/53,5 bei 45cm Front, Alanin



3. Chloroform
Methanol

Abbildung 11

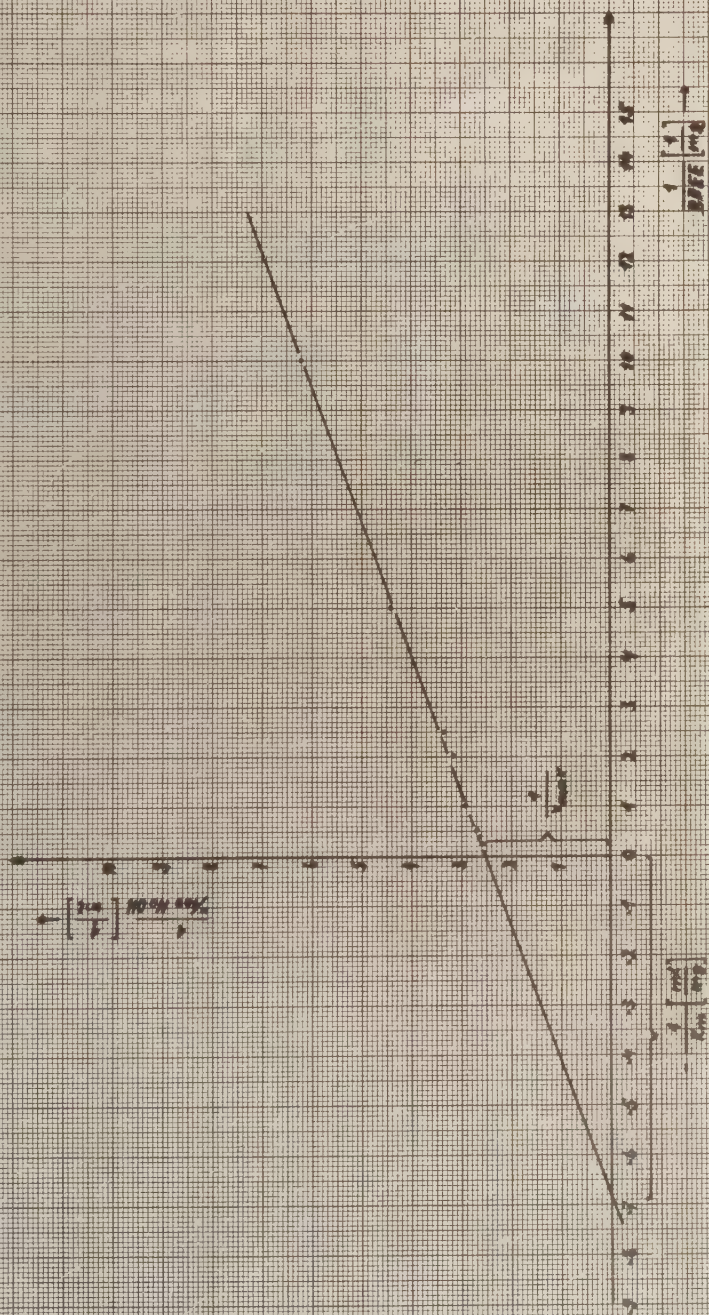


Abbildung 12

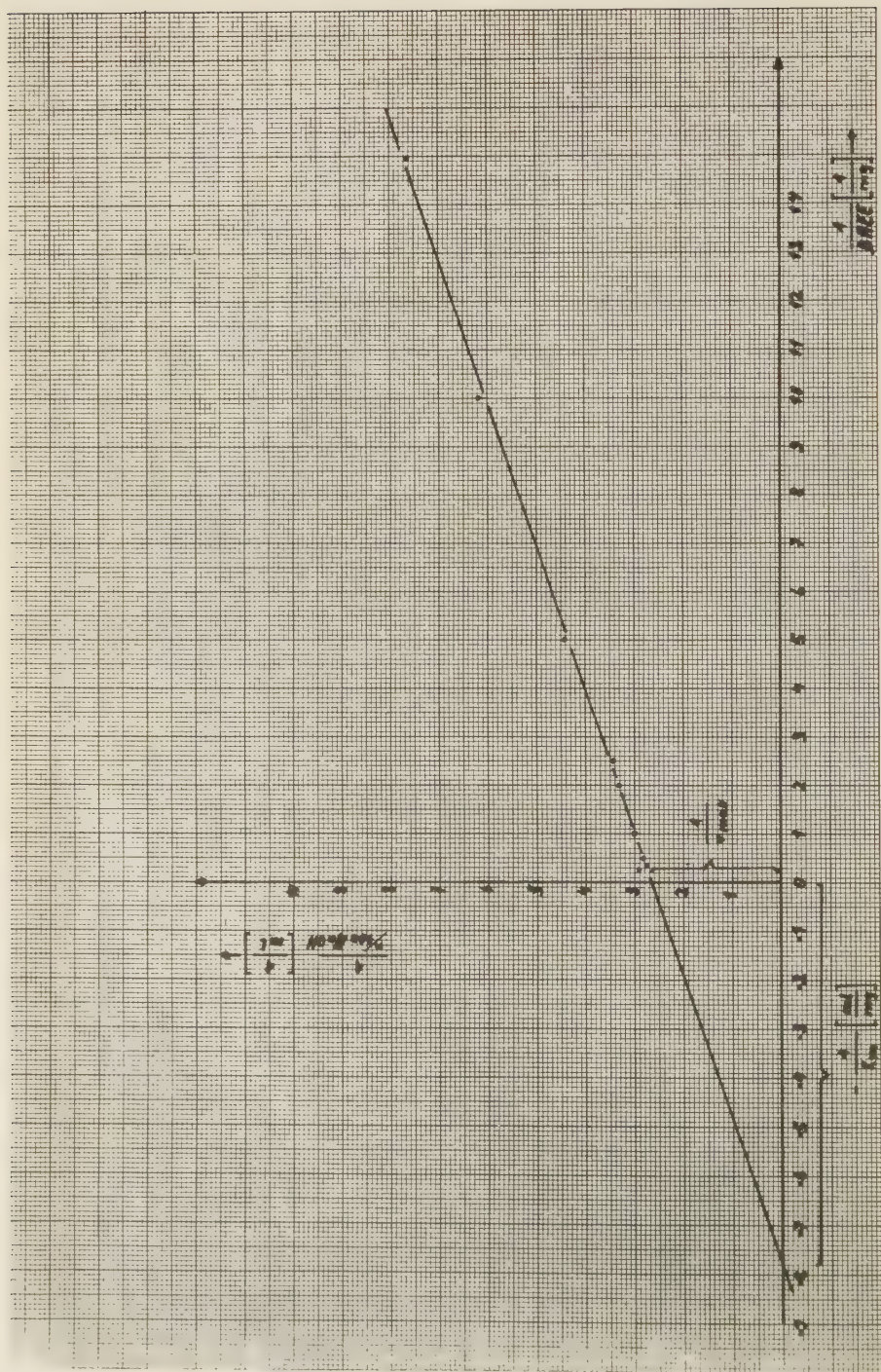


Abbildung 43

D. Zusammenfassung

Schweinepankreas kallikrein mit der spezifischen Aktivität von 10 KE/mg Protein wurde durch ausschließliche Reinigung an Hydroxylapatit-Cellulose - abgesehen von einer Protaminsulfatfällung und Entsalzung über Sephadex G-25 - bis zur absoluten Reinheit von $0,7 \mu\text{g}$ Protein/KE und einer Einwaage von $1,04 \mu\text{g}$ Substanz/KE, bei einer spezifischen Aktivität von 1 428,5 KE/mg Protein dargestellt.

Die absolute Reinheit des so erhaltenen Präparates wurde durch elektrophoretische Untersuchung hinsichtlich verunreinigender Zucker und Fremdproteine, durch Vergleich von Kallikrein mit und ohne elektrophoretische Endreinigung erhärtet.

Die Bestimmung der Amino-endständigen Aminosäure ergab ausschließlich Alanin. Auch damit ist die Einheitlichkeit des Präparates erwiesen.

Eindeutige Hinweise auf das Vorliegen verschiedener Schweinepankreas kallikreine finden sich nicht.

Mit diesem Präparat wurde die Michaelis-Konstante für Pankreas kallikrein bei Verwendung des Substrates BAEE am Autotitrator bestimmt. Der Wert bewegt sich zwischen

$$K_{m_{\text{BAEE}}} = 4,23 \times 10^{-4} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right] \text{ und } 3,78 \times 10^{-4} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \right];$$

er ist also relativ hoch.

E. Verzeichnis der Abkürzungen und verwendeten Materialien

Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
BAEE	N-Benzoyl-L-argininäthylester
DEAB-Cellulose	Diäthyl-aminoäthyl-Cellulose
DFP	Diisopropylfluorophosphat
KE	Kallikrein-Einheit
K_m	Michaelis-Konstante
KKR	Kallikrein
NAD	Nikotinamid-adenindinukleotid
NADH	Hydriertes Nikotinamid-adenin- dinukleotid
PAB-Cellulose	p-Amino-Benzoyl-Cellulose

Verwendete Materialien

- 1 Serva Cellulose Ionenaustauscher 45 110
Type Hydroxylapatit, Ans.Nr.16124, Reinheitsgrad p.A.
- 2 Cellulosepulver Nr.123 für die Säulenchromatographie
Karl Schleicher & Schüll, Dassel
- 3 Cellulosepulver MN 2100 Apatit 50 fein
Macherey, Nagel & Co. 516 Dürren
- 4 Celluloseacetatfolien, Membranfolien zur Elektrophorese 755
Schleicher & Schüll, Dassel

F. Literaturverzeichnis

1. Werle, E., W. Götze, A. Keppler:
Biochem. Z. 289/217 (1937)
2. Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle:
Z. physiol. Chem. 189/97 (1930)
3. Frey, E. K., H. Kraut:
Z. physiol. Chem. 157/32 (1926)
4. Frey, E. K., H. Kraut, E. Werle: Kallikrein (Padutin)
Enke-Verlag, Stuttgart 1950
5. Werle, E., P. v. Roden:
Biochem. Z. 286/213 (1936)
6. Trautschold, I.: Enzyme und Inhibitoren der Bildung und
des Abbaues gefäßaktiver Polypeptide.
Habilitationsschrift Univers. München 1965
7. Moriya, H.:
Yakagaku Zasshi 79/1 394 (1959)
8. Habermann, E.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Path. Pharmakol.
241/543 (1961)
9. Habermann, E.:
Z. physiol. Chem. 328/24 (1962)
10. Werle, E., M. Grunz:
Biochem. Z. 301/429 (1939)
11. Werle, E., R. Kehl, K. Koebke:
Biochem. Z. 321/348 (1951)
12. Gersmeyer, E. F., H. Spitzbarth:
Klin. Wschr. 39/1227 (1961)
13. Page, I., H. a. F. Ohnsted:
Amer. J. Physiol. 201/92 (1961)
14. Saameli, K., T. Eskes:
Fed. Proc. 21/400 (1962)
15. Konzett, H., H. Ehringer, P. Herzog:
Helv. physiol. pharmakol. Acta 19/C 66 (1961)
16. Fox, R. H., R. Goldsmith, D. J. Kidd, G. P. Lewis:
J. Physiol. (Lond.) 157/589 (1961)
17. Reeke, Th., E. Werle:
Z. f. d. f. exp. Med. 96/4 98 (1935)
18. Sicuteri, F.:
Triangel 6/116 (1963)

19. Carpi, A.:
Experientia (Basel) 17/326 (1961)
20. Witte, S., K.T. Schricker, E. Schmid:
Arzneimittelforschung 11/619 (1961)
21. Frimmer, M.:
Arch.exp. Path. Pharm. 245/287 (1963)
22. Lewis, G.P.:
Metabolism 13/1256 (1964)
23. Lewis, G.P.:
Ann.N.Y.Acad.Sci. 116/847 (1964)
24. Herxheimer, A., M. Schachter:
Nature (Lond.) 183/1510 (1959)
25. Levy, B.:
J. Pharmakol. exp.Ther.140/356 (1963)
26. Türker, K., B.K. Kiran, S.Kaymakalan:
Arch. int. Pharmacodyn.151/260 (1964)
27. Fregnan, G.B., A.H. Glässer:
J. Pharm.Pharmacol. 16/744 (1964)
28. Moog, E., I. Fischer:
Arch.exp.Path.Pharmakol. 249/384 (1964)
29. Wiegershausen, B., G.Stopp, M. Eichstädt:
Actabiol. med.germ. 12/443 (1964)
30. Horten, E.W.:
in M.Schachter Polypeptides S. 263
Pergamon Press, London 1960
31. Abe, K., K.Yoshinaga, I.Miwa, M.Aida, M.Maebashi, N.Watanabe:
Tohoku J.exp.Med. 82/270 (1964)
32. Hilton, S.M., G.P. Lewis:
J.Physiol. (London) 144/532 (1958)
33. Habermann, G.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.
Pharmakol. 245/230 (1963)
34. Stümer, E., A. Cerletti:
Helv.physiol.pharmacol.Acta 19/C 32 (1961)
35. Effkemann, G., E. Werle:
Arch.Gynäkol. 171/1 (1941)
36. Diniz, C.R., I.F. Carvalho:
Ann.N.Y.Acad.Sci. 104/77 (1963)
37. Berde, B., K. Saameli:
Nature, (London) 191/83 (1961)

38. Lewis, G.P.:
Ann.N.Y.Acad.Sci. 104/236 (1963)
39. Menkin, V., C.R. Warner:
Amer.J.Path. 13/25 (1937)
40. Edery, H., G.P. Lewis:
J.Physiol. (London) 160/208 (1962)
41. Landermann, N.S., M.E. Webster, E.L.Becker, H.E.Ratcliffe:
J.Allergy 33/330 (1960)
42. Webster, M.E., W.R. Clark:
Amer.J.Physiol. 197/406 (1959)
43. Diniz, C.R., I.F. Carvalho, I.Ryan, M.Rocha e Silva:
Nature (London) 192/1194 (1961)
44. Werle, E.:
Symposium in Grosse Ledder 1965
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1966)
45. Meyer, A., E. Werle:
Europäisches Pankreassympoosian 1963 Erlangen
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1964)
46. Werle, E., J. Trautschold, H. Sebening, H. Fritz, M.Hutzel:
Verhandlungen d.Dtsch.Gesellschaft
inn.Med. 70.Kongress 801 (1964)
47. Nagel, W., F. Willig:
Klin.Wschr. 42/400 (1964)
48. Nagel, W., F. Willig:
Naturwissenschaften 51/115 (1964)
49. Dennig, :
Lehrbuch d.Inneren Medizin BD I/917 (1964)
50. Bücher, Th., H. Redetzki:
Klin.Wschr. 29/615 (1951)
51. Bonnichsen, R.K., H.Theovell:
Scand.J.clin.Lab.Invest. 3/58 (1951)
52. Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse
530 (1962)
53. Weichselbaum, T.E.:
Americ.I.Clin.Path. (Techn.Sect.)
10/60 (1946)

54. Fritz, H., Eckert, I., E. Werle:
unveröffentlicht (1966)
55. Strain, H.H.:
Analyt.Chem. 23/26 (1951)
56. Fritz, H., I.Eckert, E. Werle:
unveröffentlicht (1966)
57. Hayek, E., W. Stadelmann:
angew.Chemie 67/326 (1955)
58. MacIntire, Palmer, M.:
Ind. Eng.Chem. 37/164 (1945)
59. Tiselius, A., S.Hjerten, Ö.Levin:
Archivs of Biochem. a.Biophys,
65/132 (1965)
60. Habermann, E.:
Z.physiol.Chem. 328/15 (1962)
61. Auhagen, J.:
unveröffentlicht (1966)
62. Stahl, E.:
Dünnschichtchromatographie 443 (1962)

Lebenslauf

Am 9.6.1942 wurde ich, Ignaz A u e r , röm.-kath. Konfession, als Sohn des Dr.med. Franz Auer und seiner Gattin Gertraud, geb. Götz, in Weiden i.d.OPf., geboren.

Im Jahre 1948 wurde ich in Weiden i.d.OPf. eingeschult. 1952 trat ich in das Humanistische Gymnasium Weiden i.d.OPf. ein. Dort legte ich 1961 die Reifeprüfung ab.

Im Jahre 1944 fiel mein Vater an der Ostfront. Im Jahre 1956 starb meine Mutter.

Mit dem Studium der Medizin begann ich im Herbst 1961 an der Universität München, wo ich auch am 19.10.1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung mit der Note "sehr gut" bestand. Nach drei weiteren Semestern vorklinischen Studiums in Freiburg/Breisgau folgte dort die ärztliche Vorprüfung, die ich am 24.4.1964 mit der Note "sehr gut" bestand.

Nach je einem Semester in Freiburg und Innsbruck kam ich im dritten Semester des klinischen Teils des Studiums an die Universität München zurück. Im November 1965 bat ich Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle, Vorstand des Klinisch-chemischen Instituts an der Chirurgischen Universitätsklinik München, mir ein Thema für die Dissertation zu stellen.

Nach diesem Semester werde ich im September 1967 mit der Ablegung der ärztlichen Prüfung beginnen.

